



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**  
**Facultad de Química e Ingeniería Química**  
**Escuela Profesional de Química**

**Evaluación de la interacción de nanopartículas de  
plata con factor de crecimiento epidermal para su uso  
potencial en sistemas que mejoren la regeneración de  
tejidos epiteliales**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Química

**AUTOR**

Luis Alberto PALOMINO MARCELO

**ASESOR**

Dr. Julio César SANTIAGO CONTRERAS

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Palomino, L. (2019). *Evaluación de la interacción de nanopartículas de plata con factor de crecimiento epidermal para su uso potencial en sistemas que mejoren la regeneración de tejidos epiteliales*. Tesis para optar el título de Licenciado en Química. Escuela Profesional de Química, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

CODIGO ORCID DEL AUTOR: 0000-0002-3992-3123

CODIGO ORCID DEL ASESOR: 0000-0002-1905-7029

DNI DEL AUTOR: 47454953

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica (LIDQO)

INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN:  
CONCYTEC/FONDECYT

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN: Jr. Medrano Silva 165,  
Barranco 15063, Lima, Perú

AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ: 2 años



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA**

Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209  
Ciudad Universitaria – Calle Germán Amezaga 375 – Lima 1  
"Año de la lucha contra la corrupción e impunidad"

**ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA**

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Química, bajo la Presidencia del **Dr. Mario Ceroni Galloso** (Presidente), el **Mg. Olivio Nino Castro Mandujano** (Miembro) y el **Dr. Julio César Santiago Contreras** (Asesor), habiendo presentado para tal efecto la **TESIS**, titulada "**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL PARA SU USO POTENCIAL EN SISTEMAS QUE MEJOREN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS EPITELIALES**", después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la **TESIS** elaborado por el Bachiller en Química: **LUIS ALBERTO PALOMINO MARCELO**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL de QUÍMICO**, acordaron calificarlo con la **NOTA** de:

VEINTE

(LETRA)

20

(NÚMERO)

Ciudad Universitaria, 04 de setiembre de 2019.

  
**Dr. MARIO CERONI GALLOSO**  
PRESIDENTE

  
**Mg. OLIVIO NINO CASTRO MANDUJANO**  
MIEMBRO

  
**Dr. JULIO CÉSAR SANTIAGO CONTRERAS**  
ASESOR

  
**Dra. THAIS CLEOFÉ LINARES FUENTES**  
DIRECTORA (e) DE LA E.P. DE QUÍMICA



## Dedicatoria

**A Dios.**

*A aquellos para quienes salir de casa es un reto, a aquellos que viven en el futuro y no quieren ver su presente, a aquellos quienes no pueden caminar por los mareas, a aquellos que ya no disfrutaban la vida, a aquellos que viven callados clamando por ayuda, a aquellos que se sienten solos, a aquellos que sienten que no pueden vivir sin pastillas, a aquellos para quienes demostrar sus sentimientos y emociones los aterra, pero que viven amando a sus familias, a aquellos que ocultan sus miedos y carencias en la soberbia e imprudencia. A aquellos que a pesar de todo lo anterior, se esfuerzan, luchan y están al frente de la vida logrando sus objetivos, a todos ellos no solo les dedico el presente trabajo sino también mi vida entera.*  
*A aquellos que todavía buscan la felicidad.*

*A mis abuelos.*

*A mi familia, Mercedes Marcelo, César Palomino, César Palomino Jr. y Gustavo Palomino.*

*A Juan Carlos Rodríguez Reyes.*

*Con amor,*

*A Cristina Guerra.*

*A Christine Kassuba.*

## Agradecimientos

A CONCYTEC Perú (convenio 155-2015-FONDECYT) por el financiamiento del proyecto “Estudio del potencial diferencial de péptidos biológicamente activos del secretoma de células madres mesenquimales en regeneración de tejidos dañados y desarrollo de un procedimiento de aislamiento y carga de estos péptidos sobre nanopartículas como vector de transporte de tejido dañado” del cual esta tesis es parte.

Al Dr. Juan Carlos Rodriguez (UTEC) por su confianza en mi capacidad profesional, por toda su instrucción y disponibilidad de asesoramiento durante el tiempo de desarrollo del presente trabajo, por haber hecho posible mi estancia en Cleveland Clinic, por su compromiso con el desarrollo de la educación superior en el país y sus aportes al área de química de los materiales y superficies. A nivel personal, por su intachable comportamiento ético, por mostrarme con el ejemplo cómo convertirme en un mejor profesional, pero sobre todo cómo convertirme en una mejor persona. Por toda su comprensión y cariño.

Al Dr. Julio César Santiago (UNMSM) por su asesoramiento en el desarrollo de esta tesis, por su disponibilidad en brindarme los materiales necesarios para el desarrollo del presente trabajo, por sus consejos y su apoyo a mi desarrollo personal y profesional.

Al Dr. Julio Valdivia (UTEC) y Dr. D. Geoffrey Vince (Cleveland Clinic) por la confianza depositada en mi potencial humano y profesional. Así mismo, por todo la estima, respaldo y apoyo brindados durante los últimos años.

Al convenio para la investigación entre UTEC y Cleveland Clinic por permitirme expandir mis conocimientos acerca del uso de las nanopartículas en campos de la ingeniería biomédica a través de mi estancia científica en Lerner Research Institute (Cleveland Clinic, Ohio, USA).

A los doctores de Lerner Research Institute Cleveland Clinic: Dr. Anand Ramamurthi y Dr. Vijay Krishna, por permitirme colaborar en sus laboratorios. A mi mentor Mg. Andrew Camardo por su capacitación en el uso de diversos equipos y técnicas para la síntesis de nanopartículas. Así mismo a las estudiantes de doctorado Sarah Carney y Shataakshi Dahal por todo su apoyo durante mi estancia en Cleveland.

A Robin Dickinson y DundeeCell Products por la generosa donación del rh EGF.

A Karinna Visurraga (UTEC), Luz Pérez (UTEC) y Robin Crotty (Cleveland Clinic) por el soporte administrativo durante el desarrollo del proyecto.

A los profesores Dolores Rivera, Patricio Muñoz y Aldo Guzman por todos los conocimientos impartidos durante mis años de estudio en la UNMSM y por quienes siempre guardaré un profundo respeto y estima.

A Miguel Gakiya por su amistad, respeto y soporte durante los años de estudio en la universidad y estos dos últimos años de colaboración profesional.

A Marco Málaga por su apoyo durante todo el desarrollo del proyecto.

## Lista de símbolos y abreviaciones

Nanopartículas	<b>NPs</b>
Nanopartículas de plata	<b>AgNPs</b>
Nanopartículas de oro	<b>AuNPs</b>
Nanopartículas de ácido poli láctico-co-glicólico	<b>PLGA NPs</b>
Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier	<b>FTIR</b>
Infrarrojo	<b>IR</b>
Dispersión de Luz Dinámica	<b>DLS</b>
Ultravioleta Visible	<b>UV-Vis</b>
Nitrato de plata	<b>AgNO<sub>3</sub></b>
Buffer fosfato	<b>PB</b>
Medio Luria-Bertani	<b>Medio LB</b>
Fuerza centrífuga relativa	<b>RCF</b>
Microscopía electrónica de transmisión	<b>TEM</b>
Resonancia de plasmones superficiales	<b>SPR</b>
Potencial zeta	<b>ZP</b>
Factor de crecimiento epidermal recombinante humano	<b>rh EGF</b>
Albúmina de suero bovino	<b>BSA</b>
Unidad de colonias formadoras por mililitro	<b>CFU/mL</b>



## Tabla de Contenidos

Capítulo 1 Introducción .....	1
1.1. Nanotecnología en medicina regenerativa .....	1
1.1.1. Tipos de nanopartículas como vectores de transporte. ....	3
1.1.1.1. Nanopartículas metálicas.....	3
1.1.1.2. Nanopartículas poliméricas.....	5
1.1.2. Síntesis de nanopartículas de plata. ....	7
1.1.3. Poder antibacterial de las nanopartículas metálicas.....	12
1.2. Desafíos en regeneración de tejidos .....	14
1.2.1. Mecanismo de regeneración de tejidos epiteliales.....	15
1.2.2. Biomoléculas de interés en procesos regenerativos.....	17
1.2.2.1. Albúmina de suero bovino. ....	19
1.2.2.2. Factor de crecimiento epidermal.....	20
1.3. Interacción entre nanopartículas y biomoléculas .....	21
1.3.1. Formación de proteína corona. ....	22
1.3.2. Conformación proteica.....	23
1.3.3. Métodos de caracterización de proteína corona.....	24
1.3.3.1. Espectroscopía UV-Vis. ....	24
1.3.3.2. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.....	24
1.3.3.3. Dispersión dinámica de la luz y zeta potencial.....	25
Capítulo 2 Objetivos .....	26
2.1. Objetivo general.....	26
2.2. Objetivos específicos .....	26
Capítulo 3 Parte Experimental .....	27
3.1. Reactivos.....	27
3.2. Equipos y materiales.....	28
3.3. Metodología .....	30
3.4. Síntesis de nanopartículas de plata .....	31
3.5. Síntesis de nanopartículas de plata con BSA.....	33
3.6. Síntesis de nanopartículas de plata con rh EGF .....	34
3.6.1. Eficiencia de carga.....	35
3.6.2. Liberación de rh EGF desde las AgNPs. ....	38
3.7. Evaluación de la actividad antibacterial .....	39
3.8. Caracterización estructural.....	41
Capítulo 4 Resultados y Discusión de Resultados.....	43
4.1. Síntesis de nanopartículas de plata .....	43
4.1.1. Optimización del método de Frens para la síntesis de nanopartículas de plata.....	43
4.1.2. Comparación del método de Frens y el método regular. ....	50
4.1.2.1. Cálculo de la concentración de AgNPs. ....	50
4.1.2.2. Espectroscopía UV-Vis.....	51
4.1.2.3. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	53
4.1.2.4. Potencial zeta.....	54
4.1.2.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	54
4.2. Estudio de las nanopartículas de plata en interacción con BSA .....	55
4.2.1. Espectroscopía UV-Vis.....	56
4.2.2. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	60
4.2.3. Potencial zeta.....	60
4.2.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	61

4.3. Estudio las nanopartículas de plata en interacción con rh EGF .....	62
4.3.1. En el medio de síntesis.....	62
4.3.1.1. Espectroscopía UV-Vis.....	62
4.3.1.2. Espectroscopía FTIR.....	66
4.3.1.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	70
4.3.1.4. Eficiencia de carga. ....	72
4.3.2. En medio fisiológico.....	73
4.3.2.1. Espectroscopía UV-Vis.....	73
4.3.2.2. Liberación de rh EGF desde las AgNPs.....	74
4.4. Evaluación de la actividad antibacterial de AgNPs en interacción con rh EGF .....	77
4.4.1. AgNPs con diferentes cantidades de rh EGF bajo el medio de síntesis.....	77
4.4.2. AgNPs con 4000 ng de rh EGF bajo el medio de síntesis y fisiológico. ....	78
Capítulo 5 Conclusiones .....	81
Capítulo 6 Referencias Bibliográficas .....	84
Capítulo 7 Vita.....	92

## Lista de tablas

Tabla 1 Concentraciones finales para la curva estándar de ELISA rh EGF .....	36
Tabla 2 Distribución de los sobrenadantes en la placa de lectura para el ELISA rh EGF.....	38
Tabla 3 Longitud de onda máxima y absorbancia de las AgNPs usando $\text{AgNO}_3$ a 0.6mM....	44
Tabla 4 Longitud de onda máxima y absorbancia de las AgNPs usando $\text{AgNO}_3$ a 0.8mM....	46
Tabla 5 Longitud de onda máxima y absorbancia de las AgNPs usando $\text{AgNO}_3$ a 1.0mM....	47
Tabla 6 Datos espectrofotométricos y porcentaje de variación de la reproducibilidad de síntesis.....	49
Tabla 7 Comparación de los datos espectrofotométricos obtenidos por cada método de síntesis.....	52
Tabla 8 Concentraciones y relaciones molares de AgNPs y BSA.....	55
Tabla 9 Nombre de las muestras y masas de rh EGF usados.....	62
Tabla 10 Concentraciones y relaciones molares de AgNPs y rh EGF .....	62
Tabla 11 Datos espectrofotométricos de las AgNPs en interacción con rh EGF.....	65
Tabla 12 Valores de la curva estándar del ensayo de ELISA rh EGF .....	72
Tabla 13 Porcentaje de eficiencia de carga de rh EGF sobre las AgNPs .....	73
Tabla 14 Absorbancia del rh EGF liberado desde las AgNPs a diferentes tiempos .....	75
Tabla 15 Concentración del rh EGF en pg/mL liberado desde las AgNPs a diferentes tiempos.....	75
Tabla 16 Cantidad de rh EGF en ng liberado desde las AgNPs a diferentes tiempos .....	76

## Lista de figuras

Figura 1. Representación esquemática de las terapias basadas en la nanotecnología empleadas en la cicatrización de heridas. ....	2
Figura 2. Esquema que representa la importancia de introducir AuNPs en el ámbito TERM. .	4
Figura 3. Estructura química de ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). ....	6
Figura 4. Métodos de síntesis química de nanopartículas metálicas en soluciones.....	8
Figura 5. Estructura química del citrato de sodio. ....	10
Figura 6. Estructuras químicas del ácido itacónico y dicarbonato de acetona.....	10
Figura 7. Fases de cicatrización de heridas cutáneas que representan las células y moléculas responsables de la recuperación de una barrera saludable.....	15
Figura 8. Mecanismos a través de los cuales la infección y la lesión inducen una respuesta inflamatoria regenerativa. ....	18
Figura 9. Esquema para la síntesis de AgNPs usando el (A) Método regular y el (B) Método de Frens.....	33
Figura 10. Síntesis de nanopartículas de plata usando $\text{AgNO}_3$ 0.6mM. ....	44
Figura 11. Síntesis de nanopartículas de plata usando $\text{AgNO}_3$ 0.8mM. ....	45
Figura 12. Síntesis de nanopartículas de plata usando $\text{AgNO}_3$ a 1.0 mM. ....	47
Figura 13. Espectros UV-Vis para determinar la reproducibilidad de la síntesis.....	49
Figura 14. AgNPs sintetizadas mediante (a) Método regular y (b) Método de Frens. ....	50
Figura 15. Espectros UV-Vis de las AgNPs sintetizadas mediante los métodos Frens y regular. ....	51
Figura 16. Radio de las AgNPs sintetizadas mediante los métodos de Frens y regular. ....	53
Figura 17. Micrografía mediante TEM de las AgNPs sintetizadas mediante Frens.....	55
Figura 18. AgNPs en interacción con (a) 0, (b) 8.59, (c) 19.12, (d) 20.20 y (e) 52.00 mg de BSA. Las burbujas son producidas durante la agitación el BSA no disuelto. ....	56
Figura 19. Espectro UV-Vis de las 6 muestras de AgNPs en interacción con diferentes concentraciones de BSA. Posible esquema de interacción donde a menores concentraciones de BSA hay un desestabilización de las AgNPs y se promueve la formación de un hombro alrededor de los 500 nm, mientras que a menores de concentración de BSA no hay una desestabilización de las AgNPs. ....	57
Figura 20. (A) Longitud de onda máxima y absorbancia en función a las relación molar BSA:AgNPs, (B) Radios hidrodinámicos de los dos tamaños de las AgNPs en interacción con 8.59, 20.20 y 65.00 mg de BSA y (C) Zeta potencial en relación al radio molar BSA:AgNPs. ....	59
Figura 21. TEM de las AgNPs en interacción con 20.20 mg de BSA. ....	61
Figura 22. Espectros UV-Vis de las AgNPs puras y en interacción con rh EGF. ....	65
Figura 23. Espectros UV-Vis de las AgNPs puras y en interacción con rh EGF 7 días después de sus síntesis.....	66
Figura 24. Espectros FTIR en la región amida I de las AgNPs puras y en interacción con rh EGF. ....	68
Figura 25. Segunda derivada de los espectros FTIR de diferentes cantidades de rh EGF. ....	69
Figura 26. Micrografía mediante TEM de las AgNPs puras ....	70
Figura 27. Micrografía mediante TEM de las AgNPs en interacción con 1000 ng de rh EGF.....	71
Figura 28. Micrografía mediante TEM de las AgNPs en interacción con 2500 ng de rh EGF.....	71

Figura 29. Micrografía mediante TEM de las AgNPs en interacción con 4000 ng de rh EGF.....	72
Figura 30. Espectro UV-Vis de las AgNPs puras y en interacción con rh EGF en medio fisiológico. ....	74
Figura 31. Liberación de rh EGF en ng desde las AgNPs a cada tiempo. ....	76
Figura 32. Acumulado de rh EGF en ng liberado desde las AgNPs a cada tiempo.....	77
Figura 33. OD600 de <i>Escherichia coli</i> en presencia de AgNPs puras y en interacción con rh EGF.....	78
Figura 34. <i>Escherichia coli</i> en CFU/mL en presencia de AgNPs puras y en interacción con rh EGF.....	79
Figura 35. <i>Escherichia coli</i> .....	79
Figura 36. <i>Escherichia coli</i> en presencia de 200 µg/mL AgNPs puras bajo el medio de síntesis .....	80
Figura 37. <i>Escherichia coli</i> en presencia de 200 µg/mL AgNPs 4000 ng rh EGF bajo el medio de síntesis. ....	80

## Resumen

Uno de los desafíos en la implementación del uso de nanopartículas metálicas como vehículos de proteínas es la falta de metodologías de formación de compuestos del tipo nanopartícula-proteína que permitan mantener la actividad biológica de dichas biomoléculas. En esta investigación, se presenta una metodología para la síntesis de nanopartículas de plata, las cuales se caracterizan por su facilidad de síntesis, biocompatibilidad y su naturaleza antimicrobiana, a altas concentraciones y su interacción con una proteína estándar, la albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine albumin serum*), y con factor de crecimiento epidermal (EGF, del inglés *epidermal growth factor*), la cual es una proteína de interés para la regeneración de tejido epitelial. La interacción nanopartícula-proteína ha sido caracterizada mediante espectroscopía UV-Visible, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, del inglés *fourier-transform infrared spectroscopy*), dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés *dynamic light scattering*), potencial zeta (ZP, del inglés *zeta potential*) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscopy*). La evaluación de la actividad antibacterial fue evaluada en cultivos de *Escherichia coli*. Se demostró que con un tiempo de reacción de 20 minutos y una concentración inicial de 1.0 mM de nitrato de plata, AgNPs de 33 mM con una baja distribución en longitud de onda máxima y absorbancia eran obtenidas. Además, bajo la metodología desarrollada una relación molar de 0.018 BSA:AgNPs fue encontrada óptima para una mayor interacción entre BSA nativo y las AgNPs. Por último, dicha metodología fue extrapolada para la interacción de AgNPs con 1000, 2500 y 4000 ng rh EGF, encontrando una mayor eficiencia de carga, mayor velocidad de liberación y una mayor estabilidad de la proteína usando 4000 ng rh EGF. Los ensayos antibacteriales mostraron que la actividad antibacterial se mantuvo en las AgNPs en interacción con rh EGF aunque en menor escala en comparación con las AgNPs puras.

## Abstract

One of the challenges in the implementation of the use of metal nanoparticles as protein vehicles is the lack of methodologies for the formation of nanoparticle-protein-type compounds that allow maintaining the biological activity of said biomolecules. In this research, we present a methodology for the synthesis of silver nanoparticles, which are characterized by their ease of synthesis, biocompatibility and their antimicrobial nature, at high concentrations and their interaction with a standard protein (bovine serum albumin) and with epidermal growth factor which is a protein of interest for the regeneration of epithelial tissue. The nanoparticle-protein interaction has been characterized by UV-Vis spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), dynamic light scattering (DLS), zeta potential (ZP) and transmission electron microscopy (TEM). The evaluation of antibacterial activity was evaluated in *Escherichia coli* cultures. It was demonstrated that with a reaction time of 20 minutes and an initial concentration of 1.0 mM of silver nitrate, AgNPs of 33 mM with a low distribution in maximum wavelength and absorbance were obtained. In addition, under the methodology developed a molar ratio of 0.018 BSA: AgNPs was found optimal for a greater interaction between native BSA and the AgNPs. Finally, this methodology was successfully extrapolated for the interaction of AgNPs with 1000, 2500 and 4000 ng rh EGF, finding a higher loading efficiency, faster release rate and greater stability of the protein using 4000 ng rh EGF. Antibacterial tests showed that the antibacterial activity was maintained in the AgNPs in interaction with rh EGF although in a smaller scale in comparison with the pure AgNPs.

## **Capítulo 1**

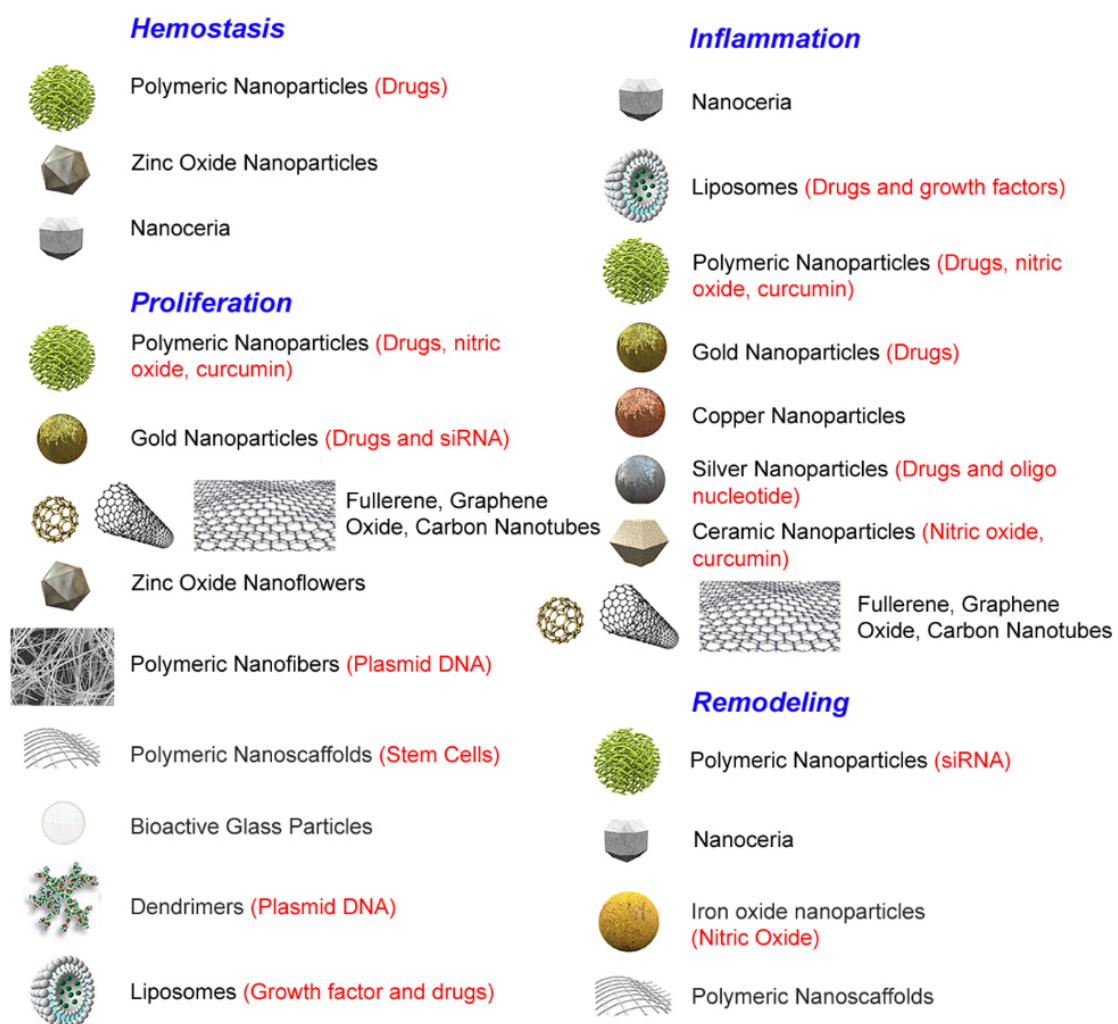
### **Introducción**

#### **1.1.Nanotecnología en medicina regenerativa**

La nanotecnología es la creación y utilización de materiales, dispositivos y sistemas a través del control de la materia a escala nanométrica (1-100 nm), es decir, a nivel de átomos, moléculas y estructuras supramoleculares, con el fin de aprovechar sus propiedades y funciones fundamentalmente nuevas resultantes de su tamaño nanométrico (Sahoo, Parveen & Panda, 2007). En las últimas dos décadas, los científicos han explotado activamente las notables características de esta tecnología para diversas aplicaciones biológicas y médicas conllevando al desarrollo de nuevas estrategias biomédicas (Zhang & Webster, 2009). Los enfoques nanoterapéuticos para la entrega de péptidos bioactivos en sistemas de regeneración de tejidos han sido desarrollados en la última década, concentrándose en la mejora de la estabilidad proteica logrando resultados significativos (Korrapati et al., 2016)(Mordorski, Rosen & Friedman, 2015). La mayor ventaja de las nanopartículas sobre otros tipos de vectores de transporte, es su relación superficie-volumen, esto otorga a las nanopartículas características únicas, por ejemplo, una alta probabilidad de interacción con el objetivo biológico y una penetración mejorada en el sitio de la herida. Como resultado, las nanopartículas tienen una capacidad para entregar una liberación sostenida y controlada de terapéuticos que resulta en un proceso regenerativo acelerado (Parani, Lokhande, Singh & Gaharwar, 2016). Otras de las ventajas indiscutibles que hacen resaltar el uso de las nanopartículas, es que permiten resolver algunos de los problemas inherentes al uso terapéutico de proteínas, como aumentar la estabilidad del péptido, resolver los trastornos inmunológicos, disminuir las alergias asociadas al



tratamiento y resolver la necesidad de repetidas administraciones (Li, 2015). A partir de esto, se ha desarrollado un número creciente de innovadoras nanoterapias en el campo de la cicatrización de heridas y hasta la fecha sigue siendo este un potencial campo de estudio. La *Figura 1* muestra las diversas estrategias en la nanoescala para dirigir las diferentes fases en la reparación de heridas (Hamdan et al., 2017).



*Figura 1.* Representación esquemática de las terapias basadas en la nanotecnología empleadas en la cicatrización de heridas. Tomado de Hamdan et al. (2017).

### **1.1.1. Tipos de nanopartículas como vectores de transporte**

Hay dos maneras principales para la clasificación de los nanomateriales utilizados en la cicatrización de heridas: mientras uno se enfoca en la relación nanomaterial/herida, el segundo se enfoca en la naturaleza y propiedades químicas intrínsecas al nanomaterial. En el primer caso, las nanopartículas pueden ser: (1) nanomateriales que exhiben propiedades intrínsecas beneficiosas para el tratamiento de la herida (donde resaltan las nanopartículas metálicas y poliméricas) y (2) nanomateriales empleados como vehículos de entrega para agentes terapéuticos (Hamdan et al., 2017). En el segundo caso, las nanopartículas pueden ser: nanopartículas de sílice mesoporosa, nanotubos de carbono, biomoléculas, nanopartículas metálicas y poliméricas (Li, 2015). Siendo las nanopartículas metálicas y poliméricas los más extensos, estos serán descritos en la presente sección.

#### **1.1.1.1. Nanopartículas metálicas**

Las nanopartículas de plata (AgNPs) y oro (AuNPs) constituyen las más prometedoras y exploradas herramientas en nanomedicina. Las nanopartículas de oro son de interés para la liberación de proteínas debido a su baja toxicidad, gran área superficial, fácil síntesis, capacidad de imagen celular y su fácil funcionalización que les permite lograr interesantes deberes en el campo de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (TERM, del inglés *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*) (Ghosh, Han, De, Kim & Rotello, 2008)(Sun et al., 2014). De hecho, la misión fundamental de AuNPs en TERM es actuar como una herramienta multimodal para mejorar las propiedades de las matrices o andamios (*scaffolds*, en inglés), la diferenciación celular y la entrega de factores de crecimiento (*Figura 2*) (Vial, Reis & Oliveira, 2016). La primera administración intracelular de proteínas utilizando AuNPs fue publicada por

Tkachenko et al. (2004), donde albúmina modificada con algunas proteínas fue absorbida sobre la superficie de AuNPs y fue entregada a citoplasma y núcleos de células funcionales, proceso en el cuál no se observó toxicidad significativa para las células.

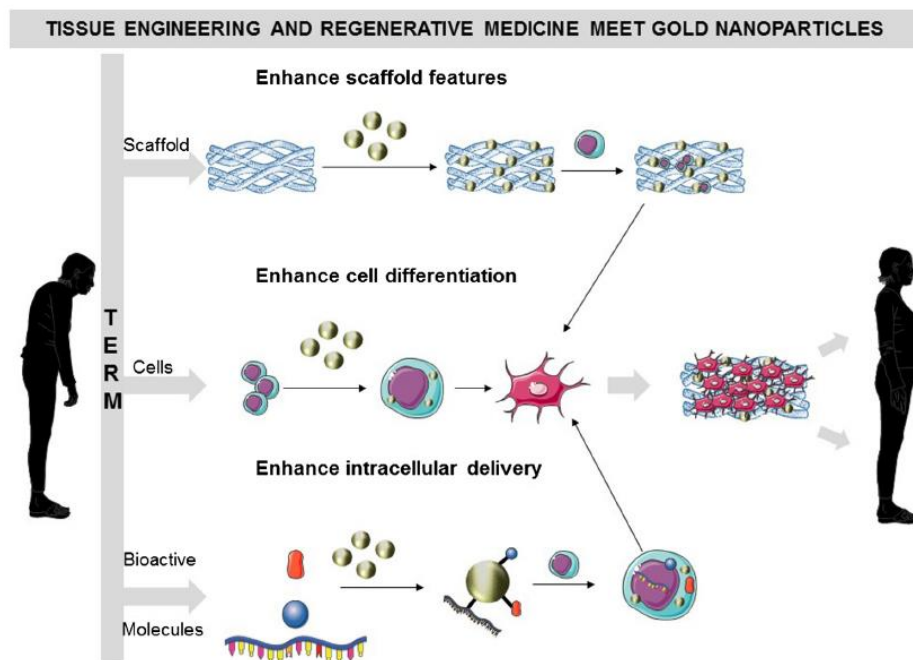


Figura 2. Esquema que representa la importancia de introducir AuNPs en el ámbito TERM.

Tomado de Vial et al. (2016).

Por otro lado, en la actualidad las AgNPs son clínicamente utilizadas para su aplicación tópica o impregnada en *scaffolds*, donde sus propiedades antimicrobianas (de las cuales se hablará más adelante) y antiinflamatorias ayudan a acelerar la reparación de la herida. Un estudio reciente ha demostrado que las nanopartículas de plata, cuando se impregnan en las nanofibras de celulosa bacteriana, aumentan la eficacia y reducen considerablemente la toxicidad (Chaudhury, Kumar, Kandasamy & RoyChoudhury, 2014). Sin embargo, hasta ahora, el número de estudios *in vivo/in vitro* acerca de su

toxicidad, estabilidad de los péptidos funcionalizados y su comportamiento en el torrente sanguíneo ha sido limitado por lo que genera un área de explotación científica. Los posibles efectos citotóxicos que se han observado en diferentes líneas celulares *in vitro* incluyen la disminución de la función mitocondrial, la contracción celular y la forma irregular, así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*). Se ha encontrado que la producción de ROS era dependiente del tamaño de partícula y su concentración. Teniendo en cuenta las propiedades antibacterianas efectivas de los AgNPs y el enorme interés en su aplicación como revestimientos para dispositivos médicos y en la terapia de heridas, su seguridad y biocompatibilidad debía ser clarificada, por lo que Rigo et al. (2013) corroboró con sus datos experimentales y un recopilado de publicaciones anteriores que el uso de apósitos basado en AgNPs para el tratamiento de heridas era seguro.

#### **1.1.1.2. Nanopartículas poliméricas**

Debido a la versatilidad y fácil control de las propiedades fisicoquímicas, las proteínas de conjugación con polímeros se han adaptado ampliamente para propósitos terapéuticos. Los polímeros pueden proteger las enzimas de interacciones no deseadas con el entorno, mejorar la estabilidad de la enzima, reducir la activación inmune y prolongar el tiempo de circulación. Los polímeros, particularmente catiónicos, pueden también facilitar la administración intracelular de proteínas.

Los efectos de la administración de proteínas son altamente dependientes de las propiedades fisicoquímicas de los polímeros, tales como hidrofiliicidad, longitud de cadena, arquitectura de cadena (es decir, lineal frente a ramificados) y la biocompatibilidad (Gauthier & Zhao, 2010). Los esfuerzos para desarrollar formulaciones basadas en ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA, del inglés *poly(lactic-*

*co-glycolic acid*)) (Figura 3) para la entrega de proteínas y péptidos se han intensificado en los últimos años, en parte debido a la aprobación de su uso biomédico dada por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*). Los péptidos en general no pueden ser fácilmente administrados oralmente o a través de la piel, ya que éstas tienen semividas cortas *in vivo*. Por lo tanto, se administran principalmente vía intravenosa, lo cual requiere de inyecciones diarias que clínicamente indeseable debido a la incomodidad del paciente, el malestar psicológico y el cumplimiento deficiente con las autoinyecciones.

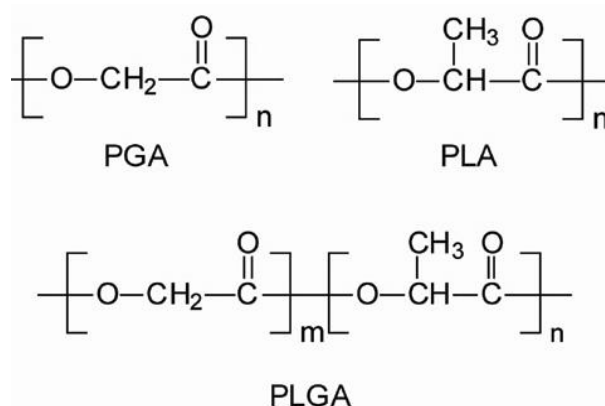


Figura 3. Estructura química de polímeros comúnmente empleados en la fabricación de nanopartículas poliméricas: ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA).

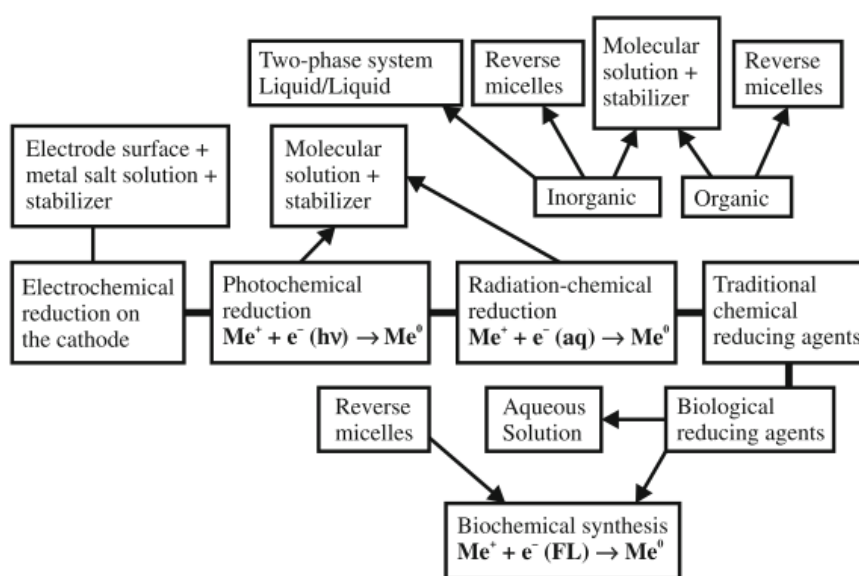
Para reducir la frecuencia de las inyecciones, los fármacos proteínicos y peptídicos encapsulado en PLGA NPs se pueden administrar fácilmente a través de diversos métodos. Por ejemplo, la forma actual en el mercado para la entrega de pequeñas proteínas y péptidos en PLGA NPs han reducido las inyecciones múltiples a una vez cada tres meses (Mundargi, Babu, Rangaswamy, Patel & Aminabhavi, 2008). Durante este tiempo de incubación, las grandes proteínas globulares deben permanecer

encapsuladas a la temperatura fisiológica, lo que plantea retos importantes sobre la retención de su integridad estructural y la actividad biológica. Una lectura de la literatura indica que hay un menor número de publicaciones que se concentran en NPs cargados de péptidos/proteínas en comparación con micropartículas. La mayoría de los estudios se refieren a los polímeros de PLGA en PBS para la administración de proteínas, además la mayoría de las partículas se preparan en micrones y tamaños submicrónicos para experimentos *in vivo*, sin embargo, los datos de % eficiencia de encapsulamiento variaron dependiendo de la naturaleza de la proteína o péptido. Es evidente que las PLGA NPs son dispositivos apropiados para suministrar fármacos peptídicos, puesto que ahora se investigan continuamente para administración oral (Mundargi et al., 2008). Jung, Breitenbach y Kissel (2000) discuten el papel de los parámetros para la formulación de PLGA NPs tales como tamaño, carga superficial e hidrofobicidad, los cuales afectan la absorción intestinal de los péptidos; las NPs de tamaño más pequeño mostraron mayor captación que las más grandes, pero una combinación de carga superficial e hidrofilia polimérica es favorable para la liberación de péptidos.

### **1.1.2. Síntesis de nanopartículas de plata**

En los últimos años, ha surgido una gran diversidad de métodos para la síntesis de nanopartículas metálicas, incluyendo varios tipos y sus variantes. Los métodos para la síntesis de las nanopartículas les proveen propiedades características que van desde su tamaño hasta sus propiedades superficiales, estas tienen un impacto frontal con la interacción con los péptidos y el cuidado de su estabilidad, por lo que es adecuado elegir métodos de síntesis adecuados y usando reactivos de la menor toxicidad posible. Mikhailovna, Amirkhanovich e Ivanovich (2016) sostiene que para los propósitos

específicos requeridos en el presente trabajo debemos limitarnos a la consideración de la síntesis química de nanopartículas en soluciones (coloides), la razón principal es que los efectos biológicos se estudian principalmente con soluciones de nanopartículas. Esta colección de métodos se muestra en la *Figura 4*.



*Figura 4.* Métodos de síntesis química de nanopartículas metálicas en soluciones.

Tomado de Mikhailovna et al. (2016).

El esquema presentado comprende todos los métodos basados en la reducción de los iones metálicos en soluciones, estos difieren solo en el tipo de agente reductor y en el sistema utilizado para la síntesis. También se incluyeron métodos de preparación de nanopartículas en soluciones no acuosas, así como en micelas inversas. Teniendo en cuenta las diversas direcciones de síntesis que se puede tomar, se debe poner central atención en los principios de síntesis y los parámetros de las nanopartículas relacionadas con su aplicación en los estudios de efectos biológicos, lo cuales son: el tamaño de las nanopartículas, el grado de polidispersidad (anchura de la distribución

del tamaño), su forma, concentración y duración en solución. Como esquema general, la síntesis química se basa en la reducción de iones metálicos a átomos seguido por la agregación de átomos e iones con la formación de conglomerados y nanopartículas metálicas. La síntesis puede llevarse a cabo en soluciones miscibles, (acuosas y no acuosas), en soluciones inmiscibles (bifásicas) o incluso en sistemas trifásicos (micelas inversas). Los siguientes agentes reductores se utilizan con mayor frecuencia: (1) sustancias no orgánicas como hidrazina, borohidruro sódico e hipofosfito, (2) sustancias orgánicas como citratos, formaldehído, hidroquinona, ascórbico y glucosa, (3) electrones solvatados generados por la radiación ionizante, (4) fotoelectrones emergentes bajo exposición a la radiación UV o láser y (5) electrones generados en el cátodo durante la electrólisis de soluciones que contienen sales de los correspondientes metales.

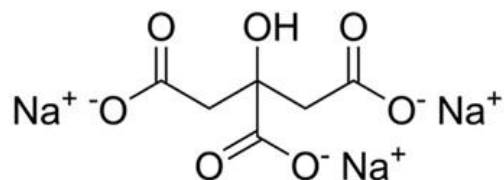
Los tipos de síntesis de acuerdo al tipo de agente reductor son: (1) síntesis puramente química, (2) síntesis química asistida por radiación, (3) síntesis fotoquímica y (4) síntesis electroquímica. En cada caso, los estabilizadores se utilizan para evitar la agregación de partículas y proporcionar el estado sostenible del sistema (Mikhailovna et al., 2016).

Las reducciones usando citrato de sodio y borohidruro de sodio se han convertido en los métodos puramente químicos más importantes.

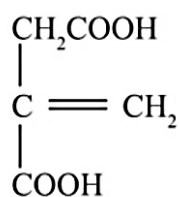
a. *Método de citrato de sodio*, se utiliza para la preparación principalmente de nanopartículas de Au y Ag. Esta sal cuya estructura es mostrada en la *Figura 5*, actúa tanto como agente reductor como estabilizador, por lo que su concentración determina la velocidad de reducción, la cinética de crecimiento y la estabilidad de las nanopartículas. Los dos últimos están influenciados también por productos de



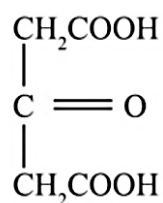
oxidación de citrato (dicarbonato de acetona y/o itaconato de sodio); las fórmulas estructurales de los ácidos correspondientes se dan en la *Figura 6*.



*Figura 5.* Estructura química del citrato de sodio.



Itaconic acid

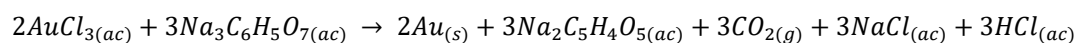


Acetone dicarbonic acid

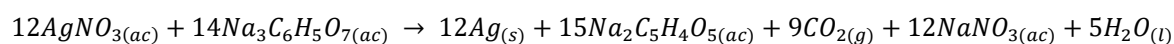
*Figura 6.* Estructuras químicas del ácido itacónico y dicarbonato de acetona.

Tomado de Mikhailovna et al. (2016).

Este método se utiliza generalmente para la preparación de nanopartículas de oro, aunque no descarta su uso para nanopartículas de plata. La reacción de la reducción de los iones metálicos con el proceso de oxidación a dicarbonato de acetona es:



(Ecuación 1)



(Ecuación 2)

La síntesis de nanopartículas metálicas usando citrato de sodio tiene lugar a 100 °C para aumentar el poder reductor de la sal. El proceso de formación de nanopartículas está

fuertemente afectado por la relación de los iones metálicos a la concentración de agente reductor, el pH de la solución, el tiempo de ebullición y la velocidad de mezcla de los reactivos. Si la concentración de citrato es insuficiente para estabilizar los grupos que aparecen, el crecimiento de las partículas se produce por medio de la agregación, el tamaño de partícula es mayor y la distribución de tamaño es más ancha. La velocidad de mezcla de reactivos afecta la velocidad de formación de conglomerados y la de crecimiento de nanopartículas. La inyección rápida del agente reductor conduce a la formación extremadamente rápida de núcleos, seguido de su crecimiento más lento. Debido a la alta concentración de núcleos, la probabilidad de su agregación aumenta, y esto resulta en el mayor tamaño medio de las nanopartículas. En la inyección gradual de citrato disminuye la velocidad de reducción de los iones metálicos, los procesos de formación de núcleos y el crecimiento de las nanopartículas se desarrollan en paralelo, por lo que la probabilidad de agregación es menor y por ende también es menor el tamaño de las nanopartículas resultantes (Val'dner, Vdokimov & Mishina, 2010). El promedio del tamaño y grado de polidispersidad de la nanopartícula disminuye con el aumento del pH (en el rango de 4.5-6.5), presumiblemente debido al aumento de la densidad de carga negativa de la nanopartícula estabiliza mejor la protección del citrato impidiendo la agregación. La forma de las nanopartículas depende del pH, por ejemplo, a pH 4,5, se forman poliedros y elipsoides, a  $5 < \text{pH} < 6$  predominantemente elipsoides, y pH 6,5-esféricas (Patungwasa, 2008). El método de citrato para la síntesis de nanopartículas de plata conllevan a una reducción más lenta y las nanopartículas están inclinadas a su agregación, sin embargo, su uso es menos toxico en comparación de otros reductores lo que le da una ventaja significativa. Por otro lado, también es conveniente el uso del citrato como estabilizante y buscar otros posibles agentes

reductores. La variación de la concentración de citrato, sal de plata y el pH conllevan al cambio de forma de las nanopartículas (Mikhailovna et al., 2016). Por ejemplo, la síntesis de AgNPs usando citrato a pH 9 y NaOH para regular el pH resulta en la formación de nanobarras/nanohilos que tienen un menor poder antibacterial que las nanopartículas esféricas formadas a pH 6.

*b. Método de borohidruro de sodio*, se utiliza para la preparación de nanopartículas de muchos metales de transición y metales pesados, tales como Au, Ag, Cu, Pt, Rh, Pd, Fe, Co, Ni, Cd, Hg, Pb y otros. Su eficiencia de reducción aumenta con la disminución del pH como consecuencia de la hidrólisis de  $\text{BH}_4^-$  con la formación de productos intermedios con propiedades reductoras más pronunciadas. La combinación de borohidruro de sodio con agentes estabilizantes puede dar la producción de nanopartículas pequeñas que se agregan lentamente con el cambio correspondiente en la posición máxima de absorción, por ejemplo, Pinto y Ferreira (2010) lograron la síntesis de nanopartículas esféricas monodispersas mediante diferentes relaciones  $[\text{BH}_4^-]/[\text{Ag}^+]$  (con exceso de iones de plata) que fueron almacenados durante 1 año. El sistema se controló mediante mediciones de los espectros de absorción y se encontró que inicialmente las nanopartículas tenían un tamaño de 5 nm, este tamaño medio no sufrió cambios con la variación cuádruple de la relación de concentración en cuestión. Con el tiempo, se registró un aumento en la densidad óptica máxima y un desplazamiento al rojo de la banda de absorción, este último indicó el aumento en el tamaño de partícula.

### **1.1.3. Poder antibacterial de las nanopartículas metálicas**

Hay una necesidad intrínseca de mantener el área de dañada con la menor exposición a microorganismos y evitar la formación de biopelículas o *biofilms*

bacterianos, que son comunidades bacterianas encerradas en una sustancia extracelular polimérica protectora. En este sentido, las nanopartículas juegan un papel fundamental en esta función. Las nanopartículas de plata son las más conocidas por su efecto antibacteriano, esto le da una ventaja al usarlo para la curación de heridas, ya que su uso es eficaz en contra de las bacterias que forman *biofilms*. Se ha demostrado que la formación de *biofilms* asociados a las heridas inducen a la apoptosis, liberación de ROS y citocinas inflamatorias en desmedida, contribuyendo a la inflamación crónica y a la inhibición de la re-epitelización. La eliminación de estos *biofilms* siempre ha sido un desafío terapéutico debido a su naturaleza resistente a terapias antimicrobianas convencionales (Hamdan et al., 2017)(Costerton, 1999). La interacción AgNPs - bacteria puede ser explicada a través de tres enfoques, que pueden ocurrir individual o simultáneamente. El primer enfoque es que se puede dar la atracción electrostática entre AgNPs negativamente cargado (por ejemplo, usando estabilizantes aniónicos como el citrato) y residuos cargados positivamente de las proteínas integrales en la superficie bacteriana. Otra aproximación podría ser la alteración en la integridad estructural o cambios fisicoquímicos en la pared celular bacteriana. Esto puede explicarse sobre la base de la alteración en la osmorregulación de la célula bacteriana que puede causar la extrusión de material intracelular y, en última instancia, la muerte celular. Existen resultados de microscopía electrónica de transmisión que muestran que las AgNPs causan una serie de cambios en *Escherichia coli* donde la pared celular arrugada puede indicar una fuga de contenido citoplasmático fuera de la célula bacteriana. Como un tercer enfoque, las AgNPs tienden a penetrar a través de las membranas bacterianas, y esto puede facilitar su internalización donde pueden causar una inactivación celular a través de múltiples vías, pueden inhibir la replicación del ADN, bloquear la respiración

celular y generar ROS. Como se mencionó, estos mecanismos pueden ocurrir en paralelo y contribuyen al efecto antibacteriano rápido (Shekhar et al., 2014). Por otro lado, las referencias bibliográficas indican un poder bactericida menor o nulo por parte de las AuNPs (Shamaila, Zafar, Riaz, Sharif & Nazir, 2016).

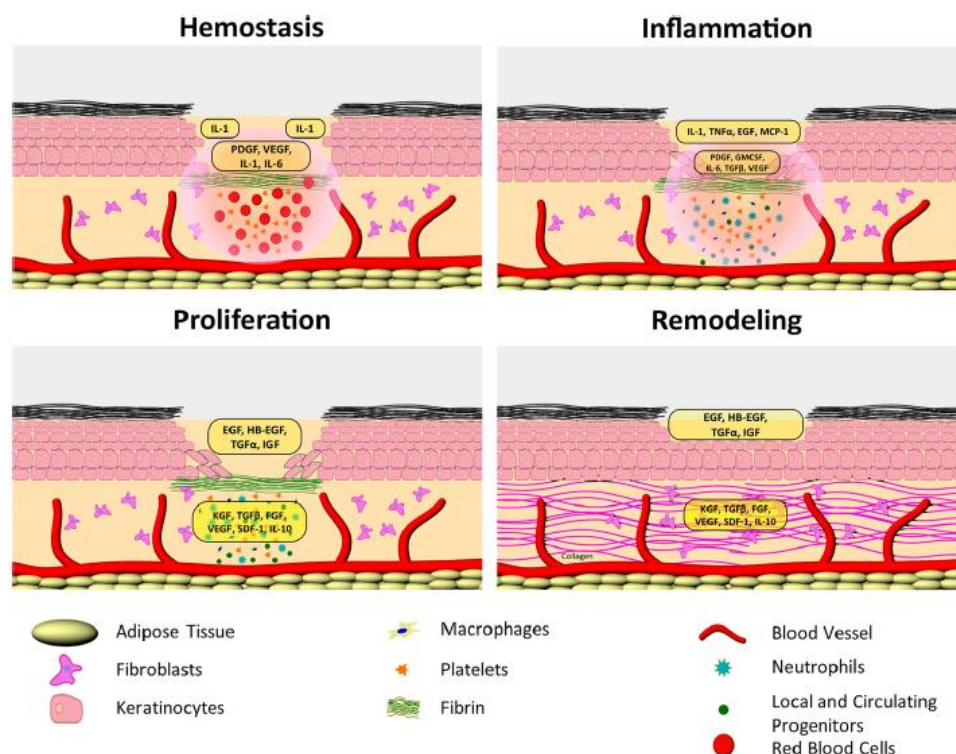
## **1.2. Desafíos en regeneración de tejidos**

Definido por primera vez en 1993 por Langer & Vacanti, la ingeniería de tejidos es “un área interdisciplinaria que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida al desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función de los tejidos o un órgano entero” (Freed et al., 1993). Por otra parte, la medicina regenerativa ha sido definida por Mason y Dunnill (2008) como “el proceso de reemplazar o regenerar células, tejidos u órganos humanos para restaurar o establecer la función normal”. Debido a los objetivos similares, estas dos vertientes se han fusionado en las últimas tres décadas, siendo globalmente referidos en asociación como ingeniería de tejidos y medicina regenerativa la cual es definida como “un área emergente centrada en el desarrollo de terapias alternativas para la reparación de tejidos y órganos donde el objetivo general es fomentar la regeneración de nuevos tejidos funcionales en lugar de simplemente implantar nuevos tejidos de repuesto” (Harris, Jenner & Snyder, 2014), para lo cual simula los procesos de regeneración natural haciendo uso de sistemas de transporte tradicionales que hasta la fecha no han logrado cumplir las expectativas de eficiencia y rendimiento deseadas. En este marco, la nanotecnología se ha convertido en un sistema prometedor no solo para el uso de nanopartículas como vectores de transporte de péptidos bioactivos, sino también como antiséptico en el área regenerativa. En los siguientes apartados de esta sección, se describirán las etapas de la regeneración tisular, las biomoléculas que intervienen en el

proceso regenerativo y las tendencias actuales en TERM, remarcando en todos los casos las limitaciones actuales existentes y la potencial oportunidad del uso de nanopartículas para mejora del proceso.

### 1.2.1. Mecanismo de regeneración de tejidos epiteliales

La regeneración epitelial es un ejemplo clínico importante de los procesos fisiológicos implicados en la regeneración de tejidos, la cual incluye de manera general cuatro fases principales y consecutivas: la hemostasia o sangrado, la inflamación, la proliferación y el remodelado (*Figura 7*) (Watson, 2012).



*Figura 7.* Fases de cicatrización de heridas cutáneas que representan las células y moléculas responsables de la recuperación de una barrera saludable. Tomado de Watson (2012).

Primero, la fase de sangrado es de relativa vida corta (de 4 a 6 horas) y ocurrirá después de la lesión. El tiempo normal para que el sangrado se detenga variará con la naturaleza de la lesión y la naturaleza del tejido en cuestión (por ejemplo, tejidos más vasculares como músculos sangran durante más tiempo, mientras que tejidos como los ligamentos sangran menos). La fase de inflamación es el componente esencial del proceso de reparación tisular, donde una serie de eventos inflamatorios necesarios para montar las bases de la regeneración son mediados químicamente por una innumerable cantidad de compuestos, donde la identificación de numerosas citocinas y GFs (factores de crecimiento) ha llevado a varios descubrimientos importantes y posibles nuevas líneas de tratamiento (Wagner et al., 2003). Para fines didácticos, las citocinas y GFs serán descritas en los párrafos posteriores. La fase de proliferación implica esencialmente la generación del material de reparación que, para la mayoría de las lesiones músculo-esqueléticas, implica la producción de material de cicatriz (colágeno). Tiene un inicio rápido (24-48 horas), pero tarda más en alcanzar su pico de reactividad, que es usualmente entre 2-3 semanas después de la lesión. Este pico de actividad no representa el momento en que se completa la producción de cicatrices (reparación), sino la fase de tiempo durante la cual se forma la mayor parte del material de la cicatriz. Por último, la fase de remodelado es una fase cuyo ciclo se extiende hasta la obtención de una cicatriz organizada, de calidad y funcional que sea capaz de comportarse de manera similar al tejido parental (el tejido que está reparando) (Watson, 2012). Cabe resaltar que todas las heridas cutáneas que se extienden profundamente en la dermis y tienen más de 1 cm de diámetro requieren un tratamiento especializado, ya que no pueden cerrarse (es decir, regenerar el revestimiento epitelial) por sí solas y pueden conducir a

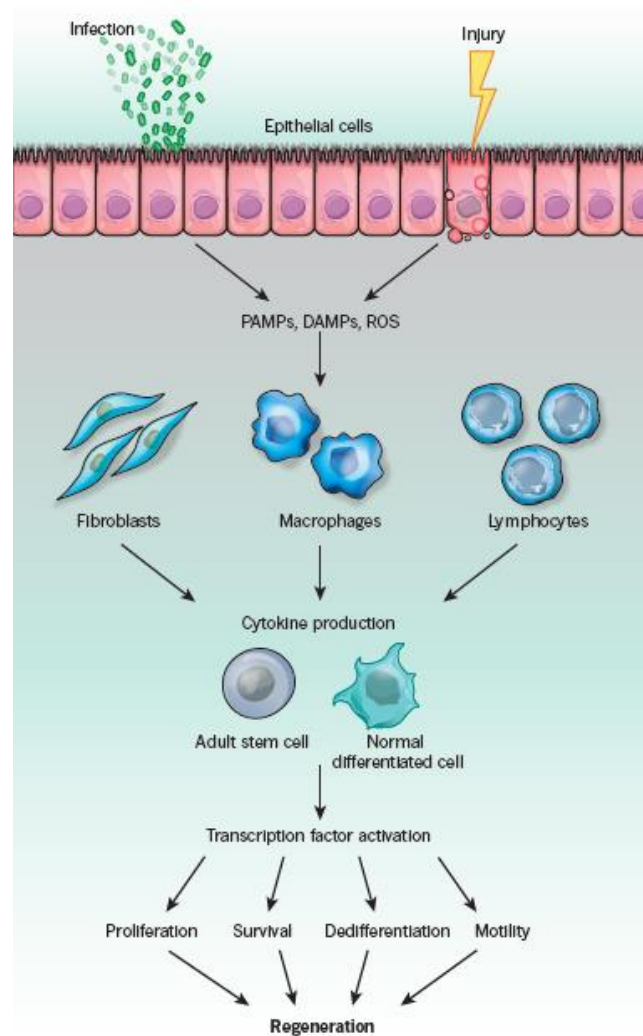
cicatrices extensas que pueden resultar en limitaciones de movilidad de las articulaciones y severas deformidades cosméticas (Papini, 2004).

### **1.2.2. Biomoléculas de interés en procesos regenerativos**

Durante la regeneración epitelial las nuevas células intervienen no sólo en la formación de nuevas células, sino también en la conectividad tisular y la comunicación celular (Cabrera et al., 2012). Estas interacciones, y, en sí, el proceso regenerativo, son promovidas por proteínas bioactivas reguladas con precisión y entregadas por el tejido circundante. Entre estos péptidos bioactivos, como se mencionó anteriormente, resaltan los GFs y las citocinas, en cuyos casos el aumento de investigaciones en torno a su papel durante la regeneración ha aumentado considerablemente en los últimos años. Por un lado, los GFs son moléculas polipeptídicas que se unen a los receptores de las células y entregan mensajes sobre migración, proliferación, diferenciación, supervivencia y secreción. Estos han sido ampliamente utilizados debido a la simplicidad de su aplicación y su precio asequible. Entre los GFs resaltantes tenemos al factor de crecimiento epidermal (EGF) y al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) los que estimulan la proliferación de células epiteliales y hepatocitos, respectivamente, además de mejorar su migración (Krafts, 2010)(Schmidt et al., 1995). Por otro lado, las citocinas también llevan mensajes importantes entre las células durante la reparación tisular. Estas pequeñas proteínas secretadas por las células del sistema inmunológico son quizás más conocidas por su papel como inmunomoduladores dentro de las células del sistema inmune adaptativo, pero hay principalmente dos citocinas que participan en la reparación tisular: la interleucina-1beta (IL-1beta) y la interleucina-6 (IL-6) que participan en la etapa de cicatrización de la reparación de tejidos. Además, se ha demostrado que la cantidad necesaria de



citocinas utilizada para la cicatrización que no presentan una tasa superior a la efectiva, logra un tiempo de tratamiento reducido en comparación a los GFs, siendo este un punto clave para su utilización (DeCarbo, 2009). La *Figura 8* muestra los mecanismos a través de los cuales la infección y la lesión inducen una respuesta inflamatoria regenerativa.



*Figura 8.* Mecanismos a través de los cuales la infección y la lesión inducen una respuesta inflamatoria regenerativa. Tomado de Karin y Clevers (2016).

La lesión o infección de tejidos epiteliales conduce a la generación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), patrones moleculares asociados a daños (DAMPs) y especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos inducen la producción de citocinas (IL-6, IL-1) a través de constituyentes de tejido tales como células inmunes. Estas citocinas inflamatorias desencadenan vías de señalización en células madre adultas o células diferenciadas normales que culminan en la activación de factores de transcripción. Estos luego montan una respuesta regenerativa induciendo genes que codifican factores de crecimiento, estimulan la progresión del ciclo celular, previenen la muerte celular y aumentan la motilidad celular (Karin & Clevers, 2016).

#### **1.2.2.1. Albúmina de suero bovino (BSA)**

Las albúminas de suero son las proteínas más abundantes en el plasma, los cuales son los principales constituyentes proteicos solubles del sistema circulatorio (Mahanthappa, Gowda & Gowda, 2016). La albúmina de suero que ha sido empleada en este trabajo es la albúmina de suero bovino (BSA), la cual es una proteína que está constituida por 582 amino ácidos con un peso molecular de 69 000 (Sklar, Hudson & Simonir, 1977). También presenta una amplia gama de funciones como es la unión, transporte y suministro de ácidos grasos, porfirinas, esteroides, etc. (Ravindran, Singh, Raichur, Chandrasekaran & Mukherjee, 2010). Se escogió la BSA como biomolécula modelo para estudiar la interacción de las AgNPs con una proteína debido a su solubilidad en agua y también a que es una de las proteínas más estudiadas para evaluar la interacción con diferentes nanomateriales (Ravindran et al., 2010)(Sapsford et al., 2013). Los estudios previos de la interacción entre el BSA y NPs muestran que a pesar de que existe una interacción electrostática entre ambos la estructura de la proteína no se ve afectada; es decir, no ocurre la desnaturalización de la proteína (Sapsford et al., 2013),

lo cual es sumamente importante ya que se sabe que la función de una proteína está directamente relacionada con su estructura.

#### **1.2.2.2. Factor de crecimiento epidermal recombinante humano (rh EGF)**

Existe diversos factores de crecimiento tales como: el factor de crecimiento epidermal recombinante humano, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de hepatocitos, entre otros (Lee, Silva, & Mooney, 2011), los cuales son polipéptidos de señalización capaces de inducir una respuesta celular en un entorno biológico específico (Cross & Dexter, 1991). Como es descrito por Esquirol-Caussa y Herrero-Vila (2017) el rh EGF es importante en la curación de heridas y quemaduras debido a que a través de su unión con su receptor específico de membrana (EGFR, del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*) promueve el crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células epiteliales para la reparación del tejido. Además, el complejo activado EGF-EGFR inicia cambios bioquímicos celulares que regulan la inflamación, la contracción de la herida, la angiogénesis y la proliferación fibroblástica y migración celular.

Como es reportado por Ogiso et al. (2002) y Yang, Wu, Huang y Tsai (2004), el rh EGF es un polipéptido de cadena simple conformado por 53 residuos aminoácidos (masa molar = 10 kDa) que contiene 6 residuos de cisteína los cuales forman 3 puentes disulfuros y son fundamentales para la afinidad con el receptor (EGFR) a cual se enlaza a través del fragmento bucle-B que es el sitio específico de enlace. Para que la unión del rh EGF y EGFR se dé de forma satisfactoria y se logre la funcionalidad del complejo es importante recalcar que estos sitios específicos de enlace, zonas de afinidad con el receptor y sitios biológicamente activos deben permanecer estabilizados.

### **1.3. Interacción entre nanopartículas y biomoléculas**

Debido a que las nanopartículas son moléculas cuyas características químicas y físicas dependen de su tamaño, se pueden establecer acercamientos interesantes y correlacionados al tratar con cuestiones biológicas fundamentales. Las nanopartículas son capaces de lograr una interacción fuerte e importante con otras moléculas. Las nanopartículas de oro y plata tienen importancia específica debido a sus propiedades físicas y químicas atractivas, biocompatibilidad, y la modificación superficial fácil. En general, las nanopartículas tienen la capacidad de interactuar con todo el entorno fisiológico una vez que entran en el cuerpo humano. En la mayoría de los casos, las primeras moléculas con la que interactúan son las proteínas, que son los principales constituyentes del cuerpo humano y la fuerza impulsora de la mayoría de los procesos biológicos. Por esto, la comprensión de la interacción entre nanopartículas y proteínas representa una esencia importante para la aplicación segura y eficiente de nanopartículas (Jasmin, 2016). Para una mejor comprensión de las interacciones entre nanopartículas y proteínas, se evalúa la interacción de diferentes combinaciones de proteínas y nanopartículas. La adsorción de la proteína en la superficie de las nanopartículas es debido a los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de solvatación, pero principalmente por las interacciones Van der Waals (Chatterjee, Chakraborti, Joshi, Singh & Gupta, 2010). Dado que las diferentes nanopartículas tienen propiedades distintas, la composición de la proteína es única para cada tipo de nanopartículas y depende de muchos parámetros (Rahman, Laurent, Tawil & Yahia, 2013). Para su evaluación, las nanopartículas rodeadas de las proteínas son aisladas e identificadas para comprender su biorreactividad. Los métodos que se pueden utilizar para estudiar las interacciones NP-proteína son numerosos, pero los más comunes son espectroscopia

infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isotérmica, resonancia de plasmón superficial (SPR), espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas, la cual se puede utilizar para muchos tipos de NPs y se utiliza para identificar proteínas y cuantificar las cantidades de proteínas adsorbidas en las NPs. La combinación de estos métodos debería proporcionar una imagen más completa sobre las interacciones proteína-nanopartícula; la estructura proteica y su conformación sobre su interacción con nanopartículas (Laurent, 2013).

### **1.3.1. Formación de proteínas corona**

Cuando las nanopartículas interactúan con un fluido biológico o simplemente con una proteína en específico se forma una capa de proteínas alrededor de la nanopartícula llamada proteína corona. Esta se forma debido a la alta energía superficial que presenta la nanopartícula, la cual es disminuida a través de la adsorción de las proteínas (Wolfram, Yang, Shen, Moten & Chen, 2014). Las fuerzas que permiten la formación de esta proteína corona son la fuerza de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas (Yang, Liu, Wang & Cao, 2013). La proteína corona no solo se forma sobre nanopartículas metálicas (Casals, Pfaller, Duschl, Oostingh & Puentes, 2010)(Shannahan et al., 2013), sino también sobre nanopartículas de poliestireno o sílice (Musyanovych et al., 2013). La proteína corona está constituida por 2 capas, dependiendo de la fuerza de interacción entre la proteína y la nanopartícula. Estas capas son llamadas la capa dura y blanda. Estas dos capas se distinguen por la fuerza con la que las biomoléculas interactúan con las nanopartículas. Además, se cree que la capa blanda es más dinámica y permite un intercambio de biomoléculas rápidamente (Wolfram et al., 2014). La composición y

estructura de la proteína corona depende de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas tales como tamaño, forma, composición, carga superficial y grupos funcionales en la superficie. También depende del tiempo de contacto con el fluido biológico o proteína. Además, se sabe que la proteína corona altera la composición interfacial y el tamaño de las NPs (Lundqvist et al., 2008)(Wolfram et al., 2014).

### **1.3.2. Conformación proteica.**

Cada proteína presenta una conformación diferente la cual está muy relacionada con su función biológica por lo cual es sumamente importante estudiar si hay un cambio de su conformación cuando interactúa con las NPs. Normalmente las proteínas cambian su conformación al adsorberse en la superficie de las NPs y este cambio depende mucho del tipo de superficie y la geometría de la misma. Se han hecho varios estudios sobre la influencia del tamaño de las nanopartículas sobre el cambio de conformación de las proteínas, pero los resultados todavía no son claros ya que en algunos estudios se indica que hay un aumento en el cambio de la conformación proteica cuando estas interactúan con NPs pequeñas (Wang, Zhang, Zhao, Liu & Xing, 2010). Otros estudios concluyen que son las NPs de mayor tamaño las que provocan un mayor cambio de la conformación proteica (Lacerda et al., 2010). La explicación de por qué ocurre este cambio de conformación todavía no se ha determinado como un fenómeno general para todas las proteínas, pero si para algunas en específico como el BSA y mioglobina. Para el caso de la mioglobina el cambio de conformación es debido a la curvatura de la superficie de las NPs metálicas, pero el potencial de la doble capa dependientes de la geometría también juega un papel importante en este cambio. Sin embargo, para el caso del BSA el potencial de la doble capa no influye en el cambio de la conformación ya

que en este caso solo ocurren interacciones hidrofóbicas entre el BSA y las NPs metálicas (Satzler, Svec, Sekot & Jungbauer, 2016).

### **1.3.3. Métodos de caracterización de proteína corona.**

La caracterización de una proteína corona es sumamente importante para entender como han interactuado las proteínas con las NPs y también para ver si ha habido algún cambio fisicoquímico en alguno de estos dos componentes. Hay diferentes técnicas para la caracterización de la proteína corona como son la espectroscopia UV-Vis, la espectroscopia infrarroja con transformado de Fourier, la dispersión dinámica de la luz y el potencial zeta (Pareek, Bhargava, Bhanot, & Gupta, 2018).

#### **1.3.3.1. Espectroscopía UV-Vis**

Las proteínas absorben la luz UV-Vis a una longitud de onda particular, la cual es 280nm y esto debido a la presencia de amino ácidos aromáticos como el triptófano, fenilalanina y tirosina (Beave, Holida & Jope, 1950). Cuando ocurre la interacción entre las NPs y las proteínas, el espectro de absorbancia de ambos se ve modificado y esto es debido a la relación entre las capacidades de transferencia de electrones de la proteína con sus propiedades ópticas (Jain, Bhargava, Rathi, Dilip & Panwar, 2015)(Yadav, Aswal & Kohlbrecher, 2015). Con los espectros de absorción se puede hacer el seguimiento de la interacción entre las NPs y las proteínas ya que el SRP es sensible al entorno de la NPs (Pareek et al., 2018).

#### **1.3.3.2. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier**

Esta técnica se basa en la identificación de grupos funcionales debido a su modo de vibración según su ambiente químico. Cada grupo funcional presenta un modo de vibración particular a una específica longitud de onda. Hay investigaciones previas en donde se ha usado la técnica de FTIR para la identificación de la estructura secundaria

de las proteínas, en la cual hacen una predicción de la estructura de la proteína sobre la base de la energía vibratoria del enlace peptídico y sugirieron que la estructura secundaria de la proteína puede presentar 3 tipos de enlace amida, enlace amida I, II y III. De estos tipos, el más importante es el enlace amida I que muestran bandas relacionadas a los giros  $\beta$ , hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$ , los cuales son específicos y sensibles a cambios estructurales y conformacionales de las proteínas pudiéndose notar su mayor o menor estabilidad (Kong & Yu, 2007). Han habido varias investigaciones en donde se ha usado FTIR para caracterizar la proteína corona (Dasgupta et al., 2016)(Jain et al., 2015).

#### **1.3.3.2. Dispersión dinámica de la luz y zeta potencial**

El espectrofotómetro de dispersión dinámica de la luz mide el movimiento browniano de la suspensión coloidal la cual se puede relacionar con el tamaño hidrodinámico haciendo uso de la ecuación de Stokes-Einstein (Bhattacharjee, 2016). Cuando ocurre la interacción entre las NPs y las proteínas el tamaño hidrodinámico de las NPs varía, esta se puede medir mediante el uso del DLS (Pino, Pelaz, Zhang, Ulrich & Parak, 2014). Por otro lado, el potencial zeta nos da información sobre la estabilidad de cualquier solución en base a las repulsiones electrostáticas entre partículas con cargas similares, es decir cuantifica la estabilidad de la carga de las NPs (Patil, Sandberg, Heckert, Self & Seal, 2007). La medición de potencial zeta está relacionado con la doble capa eléctrica que cubre las NPs y debido a que esta doble capa varía cuando se da la interacción NPs-proteínas, a su vez origina un cambio en el potencial zeta (Pareek et al., 2018).



## Capítulo 2

### Objetivos

#### 2.1. Objetivo general

Evaluar la interacción de nanopartículas de plata con el factor de crecimiento epidermal recombinante humano (rh EGF) para su uso potencial en la regeneración de tejidos epiteliales.

#### 2.2. Objetivos específicos

- a. Sintetizar nanopartículas de plata a altas concentraciones usando citrato de sodio como agente reductor y realizar su caracterización mediante espectroscopía UV-Vis, dispersión dinámica de la luz (DLS), potencial zeta y microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- b. Evaluar la interacción de las nanopartículas de plata con albúmina de suero bovino como proteína modelo.
- c. Evaluar la interacción de las nanopartículas de plata con factor de crecimiento epidermal bajo las condiciones del medio de síntesis y fisiológicas (*in vitro*).
- d. Evaluar la actividad antibacterial contra *Escherichia coli* de las nanopartículas de plata puras y en interacción con factor de crecimiento epidermal bajo las condiciones del medio de síntesis y fisiológicas (*in vitro*).

## Capítulo 3

### Parte Experimental

#### 3.1. Reactivos

Para la síntesis de las nanopartículas de plata se usó nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ , pureza del 99.8%, J.A. Elmer) y citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , pureza del 99.9%, Movilab) como precursor y agente reductor, respectivamente. Para el desarrollo de la metodología de interacción entre la nanopartícula y proteína se usó albúmina de suero bovino fracción V (pureza mayor igual al 98.5%, Sigma Aldrich) como proteína modelo. Como potencial proteína regeneradora de tejidos epiteliales se usó factor de crecimiento epidermal recombinante humana (rh EGF) expresada en *Escherichia coli* (en una formulación de 50mM HEPES/300mM NaCl/10mM metabisulfito de sodio/20% glicerol pH 8.0, Dundee Cell Products) la cual fue generosamente donada por el Dr. Robin Dickinson (Gerente General de Aruru Molecular Ltd). Para la preparación de buffer fosfato salino se usaron fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pureza del 99.0%, Merck), fosfato mono potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pureza del 99.5%, Merck), cloruro de sodio (NaCl, pureza mayor igual al 99.0%, Sigma Aldrich) y cloruro de potasio (KCl, pureza mayor igual al 99.0%, Sigma Aldrich). Para la determinación de la carga y liberación de rh EGF desde la nanopartícula se usó un kit de Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA) de rh EGF humano con sensibilidad analítica mayor que 1 pg/mL (Número de catálogo KHG0061, Thermo Fisher Scientific) el cual contenía buffer B 5x, anticuerpo biotinilado, HRP-streptavidin 600x (peroxidasa de rábano - Estreptavidina, *del inglés horseradish peroxidase - streptavidina*) y agente colorimétrico tetrametilbencidina. Todo el material de vidrio fue lavado usando agua regia fue usada para el lavado de material de vidrio. En todos los ensayos se usó agua

destilada para la preparación de las soluciones. Los reactivos fueron usados como fueron recibidos.

Para evaluar el poder antibacterial se usó *Escherichia coli* derivada de ATCC® 8739<sup>TM</sup> (número de catálogo 0483E7, Microbiologics). Como medio de cultivo se usó caldo de cultivo Luria-Bertani (Dibico). Para la preparación de placas de cultivo se usó agar MacConkey (número de catálogo DF0075-17-1, Fisher Scientific). Para la preparación de las diluciones se usó agua destilada. El agua destilada y las soluciones de caldo de cultivo y agar fueron esterilizadas antes de ser usados.

### **3.2. Equipos y materiales**

#### **3.2.1. Materiales**

- Fiolas de vidrio de 50, 100, 250 y 500 mL
- Frasco autoclavable de vidrio de 100 mL
- Vasos de precipitados de vidrio de 500 mL
- Matraces de vidrio de 250 mL
- Pipetas de vidrio de 10 mL
- Viales de vidrio de 7 mL
- Asas digralsky de vidrio
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL de plástico
- Tubos Eppendorf de 2, 1.5 y 0.6 mL de plástico
- Tubos Eppendorf ámbar de 1.7 mL de plástico
- Placas petri estériles descartables de plástico
- Placas de cultivo celular de 12 pocillos de plástico
- Agitador magnético
- Papel aluminio

- Papel pH-indicador, Macherey-Nagel
- Termómetro
- Micropipeta de 100 a 1000  $\mu\text{L}$

### **3.2.2. Equipos**

- Agitador magnético con calentamiento, Wisestir® MSH-20<sup>a</sup>
- Agitador, IKA®-Schuttler MTS 4
- Autoclave, Biogen AVDA-30L
- Centrifuga refrigerada, Sorvall® RT6000B
- Cabina de flujo laminar, Baker SterilchemGARD® III SG403A-TX
- Bomba de vacío, Edwards RV 3
- Incubadora, BINDER FP 115
- Incubadora con agitación orbital, New Brunswick Scientific G24
- Incubadora, BOEKEL 136400
- Microcentrífuga, Eppendorf® Centrifuge 5415 C
- Vortex, Fisher VM-300

### **3.2.3. Equipos de caracterización**

- Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific INC (Waltham, MA, USA), con una lámpara de flash de xenón como fuente de luz y un dispositivo de carga acoplada para analizar la luz después de pasar a través de la muestra.
- DLS y Zeta Potencial Möbiuζ, Wyatt Technology (Santa Barbara, CA, USA), con un rango de conductividad de 0 a 100 mS/cm, rango de detección del tamaño de radio de 0.2 a 250 nm usando cubetas desechables y ángulo de detección de 163.5°.

- Espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier IRTracer–100 FTIR, Shimadzu (Kyoto, Japón). Cada espectro fue producido a través de 200 barridos a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  en un rango desde  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .
- Microscopio electrónico de transmisión (TEM) FEI Tecnal F30 300kV.
- Lector de absorbancia de microplacas iMark<sup>TM</sup> con un rango de lectura desde los 400 hasta los 750 nm para un amplio rango de aplicaciones incluyendo inmunoensayos con sustancias colorimétricas tales como ELISA.

### 3.3. Metodología

La metodología del presente trabajo se divide en cuatro etapas:

La primera etapa consistió en la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) a través de reducción química utilizando citrato de sodio como agente reductor, mediante una variación optimizada del método de Frens y un método regular. Se comparó la cantidad de nanopartículas obtenidas por ambos métodos y sus caracterizaciones mediante espectroscopía UV-Vis, DLS y zeta potencial. Por último, las AgNPs obtenidas a través del método de Frens se caracterizaron mediante TEM.

La segunda etapa consistió en el desarrollo de una metodología para lograr la interacción de las nanopartículas de plata con albumina de suero bovino (BSA) la cual es comúnmente usada como proteína modelo. Dicho acoplamiento se caracterizó mediante espectroscopía UV-Vis, DLS, zeta potencial y TEM.

En la tercera etapa, la metodología desarrollada para el acoplamiento de la proteína modelo a las AgNPs se extrapoló para lograr la interacción de las AgNPs con tres diferentes cantidades de factor de crecimiento epidermal (rh EGF). Las AgNPs en interacción con rh EGF, la eficiencia de carga de rh EGF sobre la nanopartícula y su liberación bajo condiciones fisiológicas *in vitro* de 0 a 72 horas se evaluaron mediante

espectroscopía UV-Vis, FTIR, TEM y ELISA. A partir de las caracterizaciones realizadas se definió la carga óptima de rh EGF sobre las AgNPs.

Finalmente, en la cuarta etapa se evaluó el poder antibacterial contra *Escherichia coli* mediante la medición de la densidad óptica a los 600 nm (OD600) y el cultivo de la cepa bacteriana de las AgNPs puras, de las AgNPs en interacción con las tres cantidades de EGF en el medio de síntesis y de las AgNPs en interacción con la carga óptima de EGF bajo condiciones fisiológicas *in vitro*.

### **3.4. Síntesis de nanopartículas de plata**

#### **3.4.1. Síntesis de nanopartículas de plata mediante el método de Frens**

Las AgNPs se sintetizaron mediante una variación del método de Frens (Frens, 1973) como es reportado por Gakiya-Teruya, Palomino-Marcelo y Rodriguez-Reyes (2018) para lo cual en un matraz de 250 mL cubierto con papel aluminio y con un agitador magnético adentro, se vertió 50 mL de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) a diferentes concentraciones (0.6, 0.8 y 1.0 mM). Luego, la solución fue calentada y cuando alcanzó su punto de ebullición, 500  $\mu\text{L}$  de citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 0.189 M (concentración obtenida de Xu et al. (2014)) se agregó rápidamente. La solución resultante se agitó a 200 RPM (revoluciones por minuto) a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos) manteniendo la temperatura de ebullición. Las variaciones de las concentraciones del nitrato de plata y el tiempo de reacción fueron realizados con el fin de lograr la optimización del proceso. Las nanopartículas de plata se colectaron por centrifugación usando una microcentrífuga Eppendorf® Centrifuge 5415 C a 2040 RCF (fuerza centrífuga relativa) por 30 minutos y luego resuspendidas en el mismo volumen con agua destilada. Finalmente, las nanopartículas fueron guardadas a 4°C en oscuridad

para futuros análisis. El cálculo de la concentración de las AgNPs se realizó mediante la determinación del peso de 500  $\mu\text{L}$  de AgNPs secadas al vacío.

#### **3.4.2. Síntesis de nanopartículas de plata mediante el método regular**

Para la síntesis de las AgNPs por el método regular se siguió el protocolo presentado por Pinedo-Flores, Alcazar y Rodriguez-Reyes (2018). Así, en un matraz de 250 mL cubierto con papel aluminio y con un agitador magnético adentro, se vertió 50 mL de citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 7 mM que fue calentado en baño maría hasta alcanzar su punto de ebullición. Seguidamente 8.8 mL de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 2 mM fue agregado gota a gota y la solución resultante se agitó a 200 RPM por 40 minutos manteniendo la temperatura de ebullición constante. Las AgNPs se colectaron por centrifugación usando una microcentrífuga Eppendorf® Centrifuge 5415 C a 2040 RCF (fuerza centrífuga relativa) por 30 minutos y luego resuspendidas en el mismo volumen con agua destilada. Finalmente, las nanopartículas fueron guardadas a 4°C en oscuridad para futuros análisis. El cálculo de la concentración de las AgNPs se realizó mediante la determinación del peso de 500  $\mu\text{L}$  de AgNPs secadas al vacío.

*(A) Método de Frens*



*(B) Método regular*

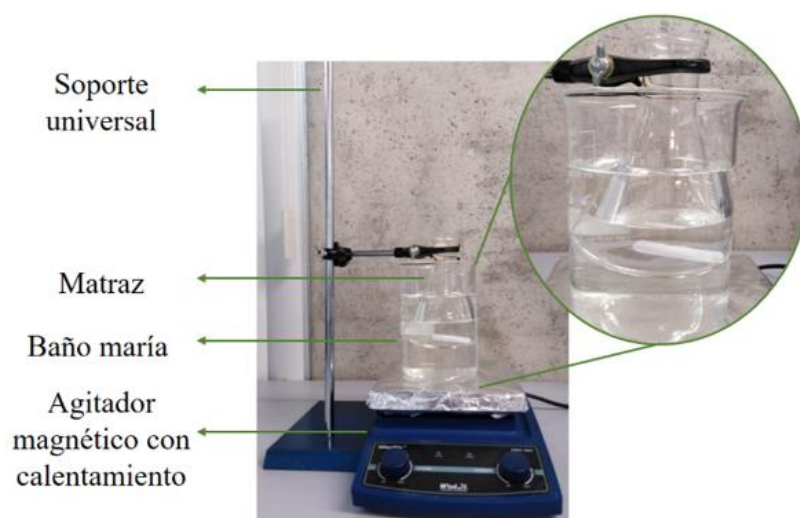


Figura 9. Esquema para la síntesis de AgNPs usando el (A) Método regular y el (B) Método de Frens.

### 3.5. Síntesis de nanopartículas de plata con BSA

En 6 viales protegidos de la luz con papel aluminio se agregaron 0.5 mL de las nanopartículas de plata sintetizadas usando la metodología descrita en el apartado previo 3.4.1. (*Síntesis de nanopartículas de plata mediante el método de Frens*) haciendo uso de una concentración inicial de 1.0 mM de nitrato de plata y un tiempo de reacción de 20 minutos. A uno de los viales se le agregó 0.5 mL de agua destilada para



hacer usado como control. Al resto de viales se le agregó volúmenes de una solución acuosa de BSA de tal manera que las concentraciones finales fueron de 8.59, 19.12, 20.20, 52.00 y 65.00 mg/mL para un volumen final de 1 mL. Todas las diluciones fueron realizadas con agua destilada. Las soluciones resultantes, con pH final de 7, fueron puestas en un agitador IKA®-Schuttler MTS 4 a 700 RPM por 4 horas. Esta metodología es una variación de la presentada por Ravindran, Singh, Raichur, Chandrasekaran y Mukherjee (2010). Las nanopartículas de plata puras y en interacción con albúmina de suero bovino fueron colectadas mediante centrifugación usando una microcentrífuga Eppendorf® Centrifuge 5415 C a 2040 RCF por 30 minutos siguiendo la recomendación dado por la compañía Citodiagnosics (2017). Finalmente, fueron resuspendidas en el mismo volumen inicial usando agua destilada y guardadas a 4°C en oscuridad para futuros análisis.

### **3.6. Síntesis de nanopartículas de plata con rh EGF**

En 7 viales protegidos de la luz con papel aluminio se agregaron 250 µL de las nanopartículas de plata sintetizadas usando la metodología descrita en el apartado previo 3.4.1. (*Síntesis de nanopartículas de plata mediante el método de Frens*) haciendo uso de una concentración inicial de 1.0 mM de nitrato de plata y un tiempo de reacción de 20 minutos. A todos los viales se le agregaron 250 µL de agua destilada, mientras a tres de los viales se le agregaron 15, 35 y 55 µL de rh EGF, a otros tres viales se le agregaron 15, 35 y 55 µL del medio de la proteína (50mM HEPES/300mM NaCl/10mM metabisulfito de sodio/20% glicerol pH 8.0) y a un vial no se le agregó nada adicional para ser usado como control. Las soluciones resultantes, con pH final de 7, fueron puestas en un agitador IKA®-Schuttler MTS 4 a 700 RPM por 4 horas. Las nanopartículas de plata puras, en el medio de la proteína y en interacción con el rh EGF

fueron colectadas mediante centrifugación usando una microcentrífuga Eppendorf® Centrifuge 5415 C a 2040 RCF por 30 minutos. Los sobrenadantes fueron guardados. Finalmente, las nanopartículas fueron resuspendidas en el mismo volumen inicial usando agua destilada y guardadas a 4°C en oscuridad para futuros análisis. Mediante espectroscopía UV-Vis, FTIR, TEM, la determinación de la eficiencia de carga (*ver sección 3.6.1. Eficiencia de carga*), la evaluación de la liberación de rh EGF desde las AgNPs en medio fisiológico (*ver sección 3.6.1. Liberación de rh EGF desde las AgNPs*) y la evaluación de la actividad antibacterial (*ver sección 3.7. Evaluación de la actividad antibacterial*) bajo las condiciones de síntesis se determinó la carga óptima de rh EGF sobre las AgNPs. Posteriormente se evaluó la actividad antibacterial de las AgNPs cargadas con la cantidad óptima de rh EGF en medio de síntesis y en medio fisiológico.

### **3.6.1. Eficiencia de carga**

Los sobrenadantes guardados de las soluciones de AgNPs puras y en interacción con EGF referidos en la sección 3.6. (*Síntesis de nanopartículas de plata con rh EGF*) fueron diluidos con Buffer B 1x (kit rh EGF ELISA) de tal manera que las concentraciones finales del rh EGF remanente (asumiendo una eficiencia de carga del 75%) estén en el rango de 0 a 1000 pg rh EGF/mL. La concentración de rh EGF remanente fue evaluada mediante un kit de Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA). Para el kit se estableció una curva estándar según lo indicado por el fabricante y el sobrenadante de las AgNPs puras fue usado como control. Para la realización del ensayo ELISA las etapas de las subsiguientes secciones fueron realizadas.

### 3.6.1.1. Reconstitución de reactivos

El Buffer B 5x (15 mL) fue llevado hasta un volumen de 75 mL con agua destilada en un frasco autoclavable de 100 mL previamente esterilizados, la nueva solución fue rotulada como 'Buffer B 1x'. La proteína rh EGF liofilizada fue disuelta en 500  $\mu$ L de Buffer B 1x y rotulada como 'Standard 12k' (12 000 pg rh EGF/mL), 100  $\mu$ L de esta solución fueron extraídos en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y rotulado como 'SO'. El Anticuerpo Biotinilado fue disuelto en 100  $\mu$ L de Buffer B 1x y rotulado como 'Ac Biotinilado 80x'. Finalmente, todas las soluciones fueron almacenadas a -30°C.

### 3.6.1.2. Preparación de curva estándar y alícuotas

Para la preparación de la curva estándar, 7 tubos Eppendorf de 1.5 mL fueron rotulados desde D1-D7. En el tubo D1 se añadió 440  $\mu$ L de Buffer B 1x y 40  $\mu$ L de la solución 'SO' y se mezcló. A los tubos desde D2 a D7 se le agregaron 400  $\mu$ L de Buffer B 1x. 200  $\mu$ L de la solución del tubo D1 fueron vertidos al tubo D2 y fueron mezclados. Luego, 200  $\mu$ L de la solución del tubo D2 fueron vertidos al tubo D3 y fueron mezclados. Esta operación fue realizada hasta el tubo D7, la que tuvo un volumen final de 600  $\mu$ L. Un tubo a parte fue rotulado como D0 y se le agregó 400  $\mu$ L de Buffer B 1x. Las concentraciones finales son presentadas en la *Tabla 1*.

Tabla 1

*Concentraciones finales para la curva estándar de ELISA rh EGF*

Tubo	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D0
Concentración (rh EGF pg/mL)	1000	333.3	111.1	37.04	12.35	4.12	1.37	0

Para la preparación de las alícuotas, en un tubo de 15 mL, se extrajeron 10 mL de Buffer B 1x. En 2 tubos Eppendorf de 0.6 mL, se extrajeron 30  $\mu$ L de ‘Ac Biotinilado 80x’ y 10  $\mu$ L de HRP-streptavidin 600x (peroxidasa de rábano - Estreptavidina, del inglés *horseradish peroxidase* - *streptavidina*). En un tubo de 50 mL se agregaron 2.5 mL de ‘Wash Solution’ y añadieron 47.5 mL de agua destilada, la solución fue rotulada como ‘Wash Solution 1x’. En dos tubos Eppendorf ámbar de 1.7 mL se alicuotaron un total de 3 mL de agente colorimétrico TMB (tetrametilbencidina). 1.4 mL de ‘Stop Solution’ fue alicuotado en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Finalmente, todas las soluciones fueron almacenadas a -30°C.

### **3.6.1.3. Evaluación de los sobrenadantes**

A 30  $\mu$ L de ‘Ac Biotinilado 80x’ se le agregaron 2370  $\mu$ L de Buffer B 1x en un tubo Falcon de 15 mL, la solución fue rotulada como ‘Ac Biotinilado 1x’. A 4  $\mu$ L de HRP-streptavidin 600x se le agregaron 2400  $\mu$ L de Buffer B 1x en un tubo Falcon de 15 mL, la solución fue rotulada como ‘HRP-streptavidin 1x’. La *Tabla 2* muestra la distribución de las soluciones en la placa de lectura, donde D0 – D7 son las soluciones estándares presentadas en la *Tabla 1*, M01 es el sobrenadante de las AgNPs con 15  $\mu$ L rh EGF, M02 es el sobrenadante de las AgNPs con 35  $\mu$ L rh EGF, M03 es el sobrenadante de las AgNPs con 55  $\mu$ L rh EGF y C01 el sobrenadante de las AgNPs puras. En todos los casos, 100  $\mu$ L de las soluciones fueron colocados en cada pocillo, luego cubiertos e incubados por dos horas y media a temperatura ambiente. Después de este tiempo, las soluciones fueron descartadas y se lavaron los pocillos 4 veces con 300  $\mu$ L de la solución ‘Wash Solution 1x’ descartando las soluciones en cada lavada. Luego, 100  $\mu$ L de ‘Ac Biotinilado 1x’ fue agregado a cada pocillo e incubado 1 hora a temperatura ambiente con agitación lenta. Se descartaron las soluciones y se lavaron 4 veces con

300  $\mu$ L de la solución ‘Wash Solution 1x’. Una vez realizado esto, 100  $\mu$ L de ‘HRP-streptavidin 1x’ fueron agregados a cada pocillo e incubado 45 minutos a temperatura ambiente con agitación lenta. Una vez más las soluciones fueron descartadas y se lavó 4 veces con 300  $\mu$ L de la solución ‘Wash Solution 1x’. Finalmente, 100  $\mu$ L de agente colorimétrico TMB fue agregado a cada pocillo, incubado 30 minutos en cuarto oscuro bajo agitación lenta y se agregó 50  $\mu$ L de la solución ‘Stop’ incluido en el kit rh EGF ELISA. La placa fue inmediatamente leída a 450 nm en el Lector de absorbancia de microplacas iMark™.

Tabla 2

*Distribución de los sobrenadantes en la placa de lectura para el ELISA rh EGF*

	1	2
A	D0	M01
B	D1	M01
C	D2	M02
D	D3	M02
E	D4	M03
F	D5	M03
G	D6	C01
H	D7	C01

### 3.6.2. Liberación de rh EGF desde las AgNPs

Los 500  $\mu$ L de las nanopartículas de plata puras y en interacción con rh EGF preparadas en la sección 3.6. (*Síntesis de nanopartículas de plata con rh EGF*) fueron vertidos en tubos Eppendorf de 2 mL estériles y se le agregaron 500  $\mu$ L de PBS 0.1%W/V BSA, las soluciones fueron colocadas a 37°C bajo agitación constante en una incubadora VWR 1530 para simular condiciones fisiológicas *in vitro*. Desde las 0 hasta las 72 horas cada 24 horas las nanopartículas puras y en interacción fueron centrifugadas a 2040

RCF por 30 minutos, los sobrenadantes fueron analizados mediante ELISA como es indicado en las secciones 3.6.1.1. (*Reconstitución de reactivos*), 3.6.1.2. (*Preparación de curva estándar y alícuotas*) y 3.6.1.3. (*Evaluación de los sobrenadantes*).

### **3.7. Evaluación de la actividad antibacterial**

Todos los procedimientos descritos en el presente apartado fueron realizados con materiales previamente esterilizados y en una cabina de flujo laminar Baker SterilchemGARD® III SG403A-TX.

#### **3.7.1. Preparación del caldo de *Escherichia coli***

50 gramos de agar MacConkey fue disuelto en un litro de agua y autoclavado a 121°C por 15 minutos. La solución fue vertida a aproximadamente 40°C en placas Petri estériles, se dejaron enfriar y fueron selladas con Parafilm. Las placas fueron guardadas a 4°C para su posterior uso. Adicionalmente, un pellet de *Escherichia coli* ATCC® 8739 fue suspendido en PBS a 37°C e incubado a dicha temperatura por 30 minutos. Luego, 100 µL de esta solución fue sembrado en una placa de agar MacConkey previamente preparado y se dejó en una incubadora BINDER FP 115 a 37°C por 24 horas. Por otro lado, el medio Luria-Bertani fue preparado y autoclavado. Posteriormente, *Escherichia coli* obtenido del cultivo sobre las placas de agar fue inoculado a 50 mL de medio Luria-Bertani y se colocó en una incubadora con agitación orbital New Brunswick Scientific G24 por 24 horas a agitación constante a 37°C. La solución obtenida fue purificada, para esto en dos tubos Falcon de 50 mL se agregaron 25 mL del caldo de *Escherichia coli*, agua destilada fue agregada para balancear los pesos de ambos tubos y fueron puestos en un vortex por 30 segundos. Luego, haciendo uso de una centrifuga refrigerada Sorvall® RT6000B las suspensiones fueron centrifugadas por 15 minutos a 2000 RCF a una temperatura de 4°C. Una vez realizada

la centrifugación, los sobrenadantes fueron descartados y 30 mL de agua destilada estéril fueron agregados a los precipitados de cada tubo. Las soluciones fueron nuevamente puestas en el vortex por 30 segundos y el proceso de lavado fue realizado por dos veces más. En la última centrifugación, el precipitado fue resuspendido en el mismo volumen inicial de 25 mL de medio Luria-Bertani y fueron guardadas a 4°C para su posterior uso.

### **3.7.2. Actividad antibacterial de las AgNPs con diferentes cantidades de rh EGF**

Para la evaluación antibacterial de las AgNPs puras y en interacción con rh EGF mediante densidad óptica de la suspensión bacteriana de *Escherichia coli* a 600 nm (OD600), 300 µL de la solución de *Escherichia coli* guardada fue vertido en 24 pocillos de una placa de cultivo celular estéril sin tratar además de 1700 µL de medio Luria-Bertani. Haciendo esta dilución una absorbancia inicial de 0.5 a 600 nm fue obtenida. Luego, para una concentración final de 50 µg/mL volúmenes de AgNPs puras y en interacción con las tres cantidades diferentes de rh EGF preparadas en la sección 3.6. (*Síntesis de nanopartículas de plata con rh EGF*) fueron agregados. A tres de los pocillos no se le agregaron nanopartículas para ser usados como controles. El OD600 fue evaluado hasta las 24 horas midiéndose la absorbancia a los 600 nm en un NanoDrop® ND-1000.

### **3.7.3. Actividad antibacterial de las AgNPs con la carga óptima de rh EGF**

*Bajo condiciones de síntesis*, las AgNPs en interacción con EGF a carga óptima preparadas en la sección 3.6. (*Síntesis de nanopartículas de plata con rh EGF*) fueron sembradas en placas de cultivo de agar MacConkey en presencia de *Escherichia coli*. Para esto, la solución de *Escherichia coli* fue diluida en una proporción de 1:10 (1 mL de *Escherichia coli* en 9 mL de Luria-Bertani) 5 veces consecutivas. Así, de la quinta

dilución, 50  $\mu\text{L}$  fueron suspendidos en 1 mL de agua destilada para ser usada como control y de agua destilada suplementada con 200 mg/mL de AgNPs y AgNPs en interacción con la carga óptima de EGF. Las soluciones colocadas en tubos Eppendorf de 2mL fueron puestas a agitación por 10 minutos. 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones finales fueron sembradas en placas de agar MacConkey previamente guardadas. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

*Bajo condiciones fisiológicas in vitro*, las AgNPs puras y en interacción con la carga óptima de rh EGF preparadas en la sección 3.6. (*Síntesis de nanopartículas de plata con rh EGF*) fueron vertidos en tubos Eppendorf de 2 mL estériles y se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de PBS 0.1%W/V BSA, las soluciones fueron colocadas a 37°C bajo agitación constante en una incubadora BOEKL 136400 para simular condiciones fisiológicas *in vitro*. Desde las 0 hasta las 72 horas cada 24 horas el poder antibacterial fue evaluado para las nanopartículas puras y en interacción mediante su plaqueo en presencia de *Escherichia coli* con la misma metodología descrita en el párrafo anterior.

### **3.8. Caracterización estructural**

La evaluación mediante espectroscopía UV-Vis de las AgNPs puras y en interacción con las proteínas a diferentes etapas del proceso de las AgNPs se realizó con un NanoDrop® ND-1000 usando 2  $\mu\text{L}$  de las muestras a medir. Para todos los casos, los resultados presentados son el promedio de tres mediciones y el error corresponde a la desviación estándar. Por otro lado, la evaluación de las estructuras proteicas puras y en interacción con las AgNPs a diferentes etapas de la metodología se midieron usando un Fourier IRTracer–100 FTIR. Las muestras a medir se secaron sobre papel aluminio a vacío y posteriormente se midieron con un ATR, en todos los casos, se realizó correcciones sobre la humedad y la cantidad de dióxido de carbono en la atmósfera



(Sukumaran 2017). La caracterización DLS y potencial zeta se realizó usando un equipo Möbiuζ utilizando la dilución de 100  $\mu$ L de la muestra a medir a un volumen final de 1000  $\mu$ L agregando agua destilada. Estas mediciones se hicieron en el laboratorio del Dr. Vijay Krishna en *Lerner Research Institute de Cleveland Clinic* (Ohio, Estados Unidos). Las imágenes de TEM se obtuvieron desde un microscopio FEI Tecnal F30 a un voltaje de 300 kV, este voltaje es de uso común para las AgNPs y sistemas biológicos ya que no afecta su estructura (Juffmann et al. 2017)(Fernández-Busnadiego & Lucic, 2012). Para todos los casos, las muestras a medir se prepararon colocando 20  $\mu$ L de la suspensión en una rejilla de cobre recubierta con una película de carbono Lacey y luego dejadas en reposo durante 60 segundos. Estas mediciones se obtuvieron a través del laboratorio del Dr. Vijay Krishna en *Lerner Research Institute de Cleveland Clinic* y fueron realizadas en *Swagelok Center en Case Western Reserve University* (Ohio, Estados Unidos).

Los siguientes softwares fueron usados para el procesamiento de datos: Igor Pro 3.13 (WaveMetrics), Statgraphics centurión XV versión 15.2.06 (Statgraphics.Net), Microplate Manager® 6 (Bio-Rad) e IR Solutions (Shimadzu).

## Capítulo 4

### Resultados y Discusión de Resultados

#### 4.1. Síntesis de nanopartículas de plata

##### 4.1.1. Optimización del método de Frens para la síntesis de nanopartículas de plata

Las nanopartículas fueron sintetizadas por una variación del método de Frens como se indica en el apartado 3.4.1. (*Síntesis de nanopartículas de plata mediante el método de Frens*) y para la optimización se evaluó la influencia de los siguientes parámetros: tiempo de reacción y concentración de nitrato de plata.

a) *Usando una solución 0.6 mM de AgNO<sub>3</sub>*. Se evaluó la formación de AgNPs mediante espectroscopía UV-Vis cada 5 minutos por un lapso total de 30 minutos para la determinación del tiempo de reacción óptimo. Como se muestra en la *Figura 10* y *Tabla 3*, los mayores valores de absorbancia se obtuvieron para un lapso de tiempo de reacción entre los 20 y 30 minutos alrededor de valores de longitudes de onda comprendidos entre los 416.8 y 428.3 nm. Según Paramelle et al. (2014) el valor de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de nanopartículas de plata contenidas en el sistema coloidal y para longitudes de onda máxima comprendidas entre los 412.3 y 431.5 nm los diámetros de las nanopartículas de plata están comprendidos entre los 40 y 60 nm, respectivamente, asumiendo una forma esférica. Debido a que la síntesis de una mayor concentración de AgNPs es requerida para lograr las futuras interacciones con las biomoléculas, los valores de absorbancia toman mayor relevancia para la elección de un método idóneo de síntesis. Además, siendo la reproducibilidad de la síntesis uno de los factores más importantes de la optimización del proceso, la evaluación de la desviación estándar para cada uno de los tiempos es realizada. Así, siendo los valores de desviación estándar de 0.23, 0.35 y 0.44 para los tiempos de

reacción de 20, 25 y 30 minutos, respectivamente, el tiempo de reacción de 20 minutos es elegido como óptimo al presentar una mayor reproducibilidad.

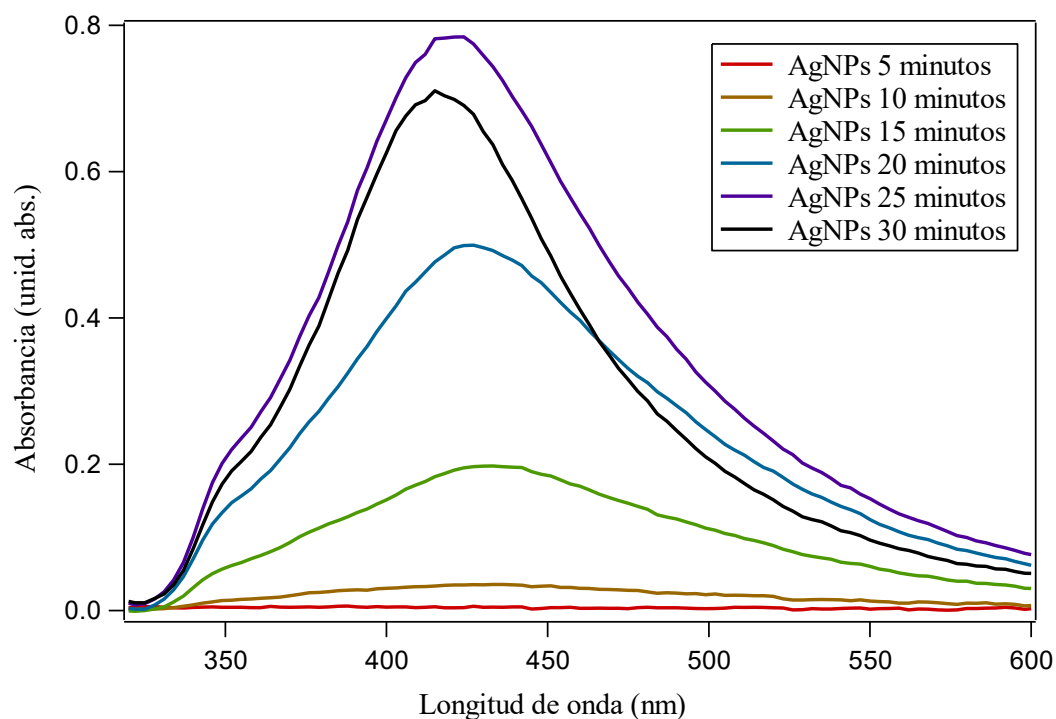


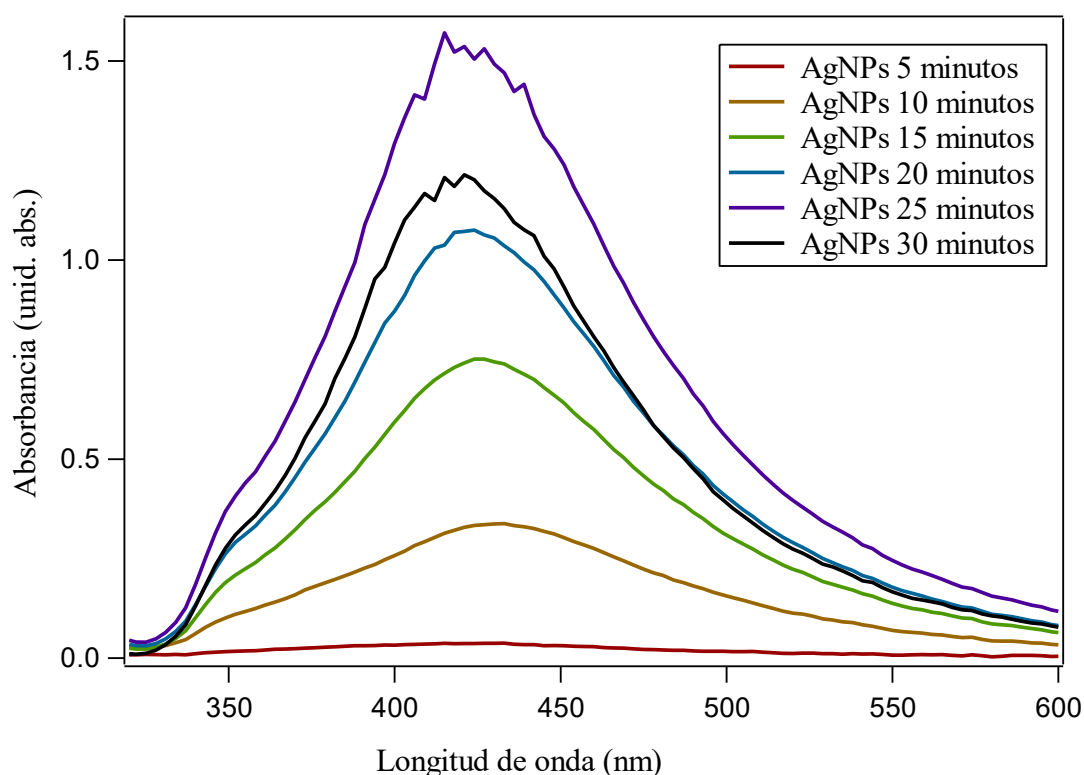
Figura 10. Síntesis de nanopartículas de plata usando  $\text{AgNO}_3$  0.6mM.

Tabla 3

*Longitud de onda máxima y absorbancia de las AgNPs usando  $\text{AgNO}_3$  a 0.6mM*

Tiempo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Absorbancia (unid. abs.)
10min	$432.8 \pm 8.2$	$0.04 \pm 0.03$
15min	$433.3 \pm 5.9$	$0.20 \pm 0.15$
20min	$428.3 \pm 7.0$	$0.51 \pm 0.23$
25min	$420.0 \pm 5.0$	$0.79 \pm 0.35$
30min	$416.8 \pm 3.4$	$0.70 \pm 0.44$

b) Usando una solución 0.8 mM de  $\text{AgNO}_3$ . Se evaluó la formación de AgNPs mediante espectroscopía UV-Vis cada 5 minutos por un lapso total de 30 minutos para la determinación del tiempo de reacción óptimo. Como se muestra en la *Figura 11* y *Tabla 4*, los mayores valores de absorbancia se obtuvieron para un lapso de tiempo entre los 15 y 20 minutos a longitudes de onda alrededor de los 424.5 y 429 nm. Para tiempos de reacción mayores a los 20 minutos se observa la formación de ruido en el espectro debido a la alta concentración de AgNPs en el sistema que no puede ser medido correctamente por el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Taylor, 2014)(Thermo Fisher Scientific, 2010). Siguiendo los mismos criterios de evaluación descritos en el apartado anterior, el tiempo de 15 minutos es elegido como óptimo debido a la mejor reproducibilidad del proceso de síntesis.



*Figura 11.* Síntesis de nanopartículas de plata usando  $\text{AgNO}_3$  0.8mM.

Tabla 4

*Longitud de onda máxima y absorbancia de las AgNPs usando  $\text{AgNO}_3$  a 0.8mM*

Tiempo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Absorbancia (unid. abs.)
10min	$431.8 \pm 1.5$	$0.34 \pm 0.28$
15min	$429.0 \pm 4.0$	$0.76 \pm 0.36$
20min	$424.5 \pm 5.2$	$1.09 \pm 0.41$

c) Usando una solución 1.0 mM de  $\text{AgNO}_3$ . Se evaluó la formación de AgNPs mediante espectroscopía UV-Vis cada 5 minutos por un lapso total de 30 minutos para la determinación del tiempo de reacción óptimo. Como se muestra en la *Figura 12* y *Tabla 5*, los mayores valores de absorbancia se obtuvieron para un lapso de tiempo entre los 15 y 25 minutos a longitudes de onda alrededor de los 417.5 y 418.38 nm. Para un tiempo de reacción 30 minutos se detectó ruido en la medición espectrofotométrica. A comparación de la síntesis de AgNPs usando concentraciones de 0.6 y 0.8 mM de  $\text{AgNO}_3$ , con 0.1 mM de  $\text{AgNO}_3$  se obtuvieron las menores desviaciones estándares para los valores de longitud de onda máxima y absorbancia para todos los tiempos evaluados denotando una mayor reproducibilidad del proceso en general. Para un tiempo de reacción de 20 minutos se obtuvo una mayor reproducibilidad en cuanto a los valores de absorbancia obtenidos en relación a una menor desviación en cuanto a la longitud de onda por lo que este tiempo de reacción fue elegido como óptimo.

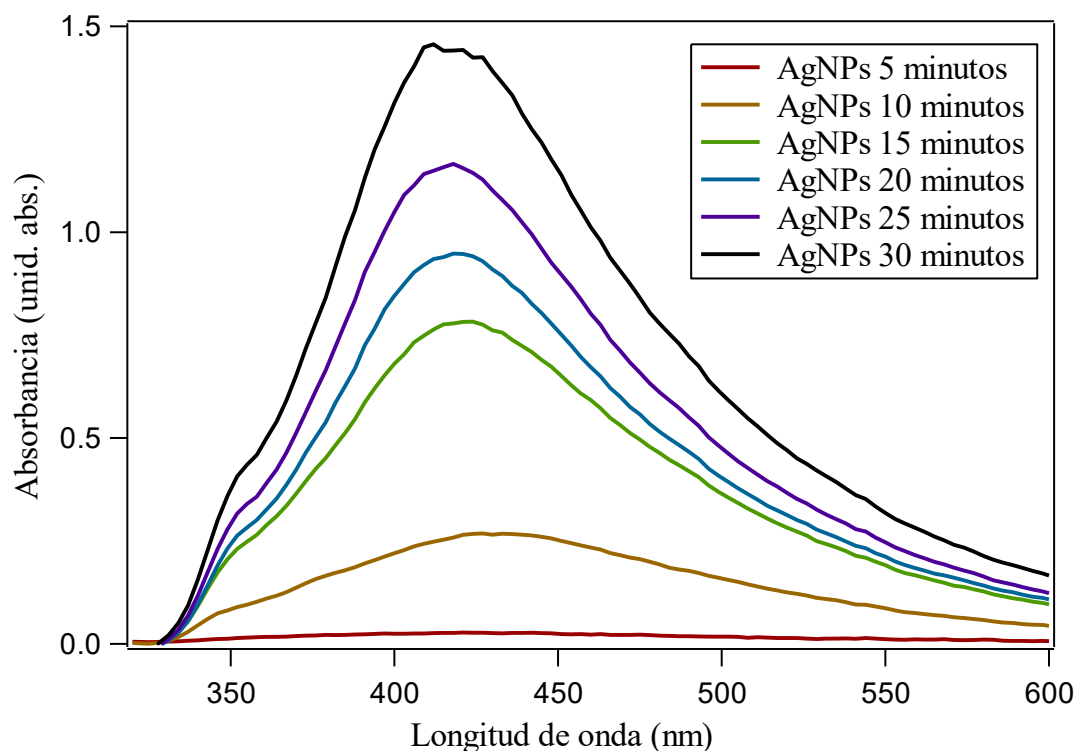


Figura 12. Síntesis de nanopartículas de plata usando  $\text{AgNO}_3$  a 1.0 mM.

Tabla 5

*Longitud de onda máxima y absorbancia de las AgNPs usando  $\text{AgNO}_3$  a 1.0mM*

Tiempo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Absorbancia (unid. abs.)
10min	$429.6 \pm 5.0$	$0.34 \pm 0.06$
15min	$418.8 \pm 4.5$	$0.79 \pm 0.11$
20min	$417.5 \pm 3.8$	$0.91 \pm 0.12$
25min	$418.8 \pm 2.9$	$1.17 \pm 0.17$

Los valores de absorbancia y longitudes de onda para los tiempos de reacción a cada una de las concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  0.6, 0.8 y 1.0 mM fueron de:  $0.51 \pm 0.23$  y  $428.3 \pm 7.0$  nm,  $0.76 \pm 0.36$  y  $429.0 \pm 4.0$  nm y  $0.91 \pm 0.12$  y  $417.5 \pm 3.8$  nm, respectivamente. Dado a que los valores de absorbancia y de longitud de onda presentan una menor desviación estándar y debido a que se obtiene un alto valor de absorbancia en conjunto

con una baja distribución, los parámetros óptimos para la síntesis de AgNPs son: un tiempo de reacción de 20 minutos para una concentración de 1.0 mM de AgNO<sub>3</sub>.

Para verificar la reproducibilidad del proceso, la síntesis se realizó por triplicado mostrándose los espectros UV-Vis en la *Figura 13*. La *Tabla 6* muestra los valores promedios y desviaciones estándares para la absorbancia, longitud de onda máxima y FWHM (anchura a media altura, del inglés *Full Width at Half Maximum*) de los tres espectros además del porcentaje de variación para cada uno de los valores. Dado que los porcentajes de variación son de 5.55 y 0.71 % para la absorbancia y longitud de onda máxima, respectivamente, se corrobora la reproducibilidad del proceso. Además, debido a que el FWHM es un indicador de la distribución del tamaño de nanopartículas en el sistema, donde a un mayor FWHM, se presenta una más amplia distribución de tamaños (Šileikaite, Puišo, Prosycevas & Tamulevicius, 2009) y el porcentaje de variación de este valor es del 4.31%, se obtiene que en la metodología de síntesis desarrollada la distribución de tamaños en el sistema se mantiene.

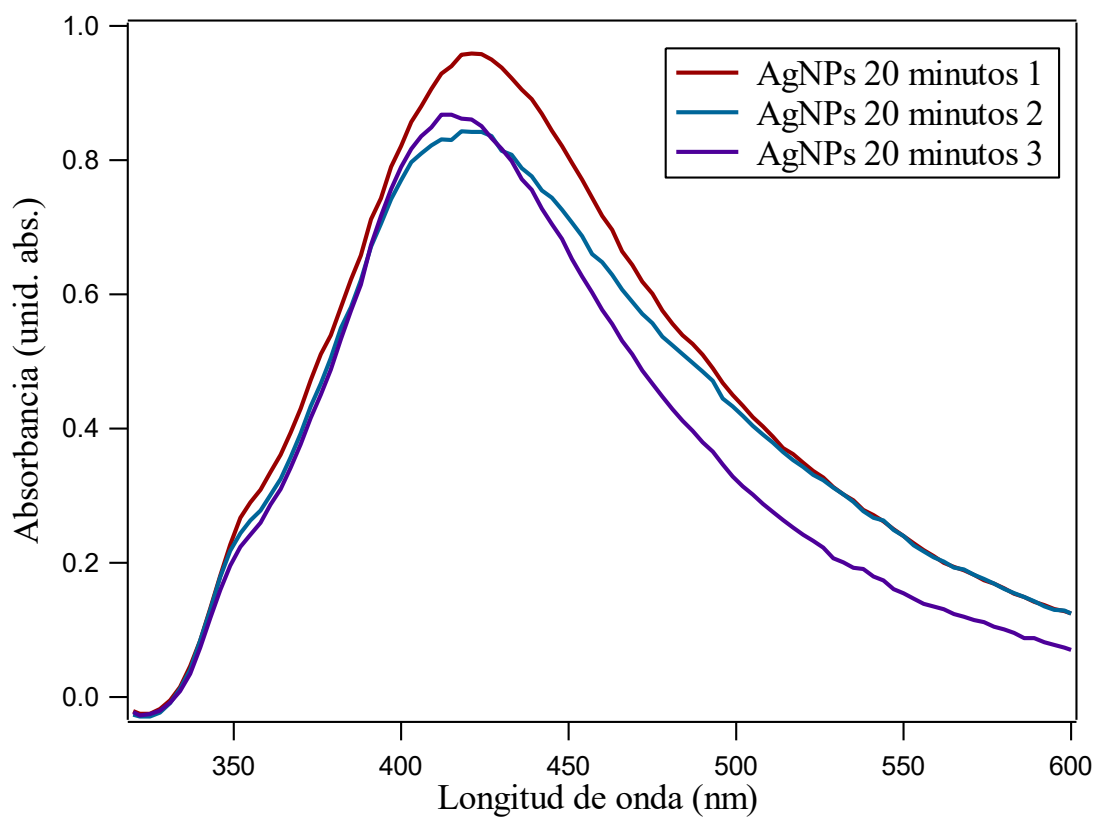


Figura 13. Espectros UV-Vis para determinar la reproducibilidad de la síntesis.

Tabla 6

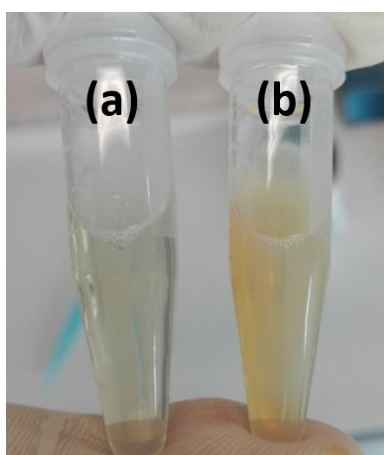
*Datos espectrofotométricos y porcentaje de variación de la reproducibilidad de síntesis*

Absorbancia (unid. abs.)	% Variación	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	% Variación	FWHM (nm)	% Variación
$0.9 \pm 0.05$	5.55	$418 \pm 3$	0.71	$116 \pm 5$	4.31



#### 4.1.2. Comparación del método de Frens y el método regular

La AgNPs sintetizadas mediante el método de Frens y el método regular mostraron un color amarillento característico, pero se evidenció una diferencia en la intensidad de color como es mostrado en la *Figura 14*. Esta diferencia de coloración fue estudiada mediante el cálculo de la diferencia de concentración, espectroscopía UV-Vis, DLS y potencial zeta.



*Figura 14.* AgNPs sintetizadas mediante (a) Método regular y (b) Método de Frens.

##### 4.1.2.1. Cálculo de la concentración de AgNPs

La concentración final de plata en gramos/L puede ser estimada según la ecuación:

$$M(Ag) = \frac{C(Ag) \times V(Ag) \times 108}{V(total)}$$

(Ecuación 3)

Donde: M(Ag) es la concentración de plata en la solución final

C(Ag) es la concentración de la solución de nitrato de plata

V(Ag) es el volumen de la solución de nitrato de plata

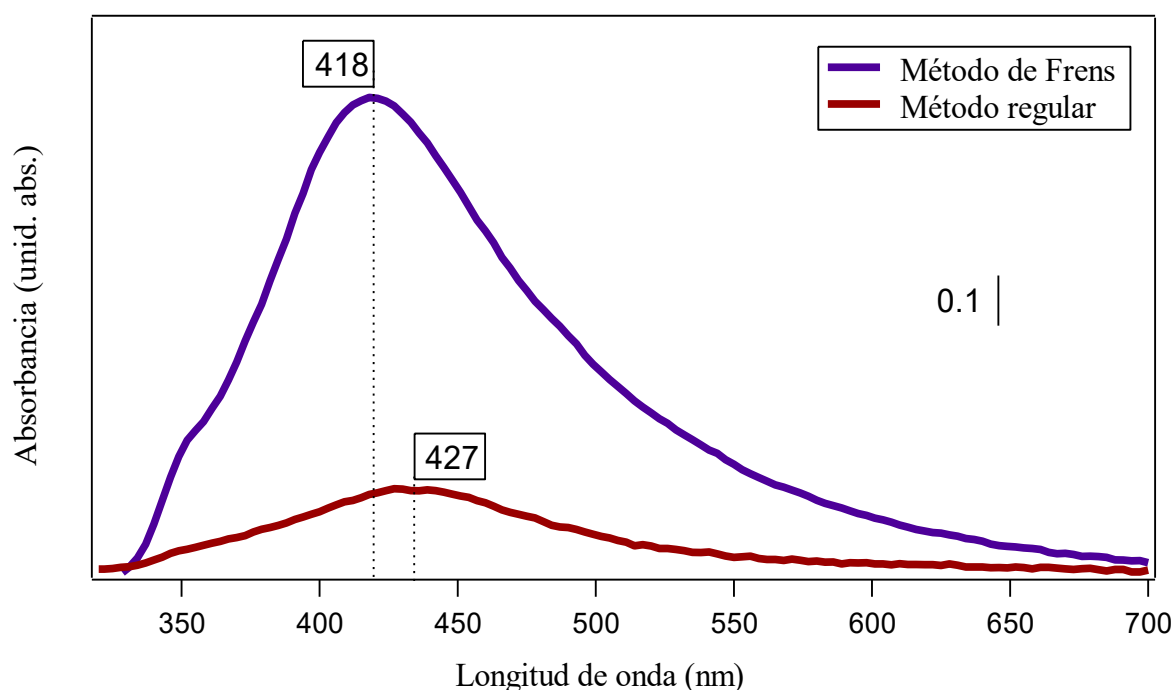
V(total) es el volumen total de la solución

108 representa el valor del peso atómico de la plata (108 g/mol)

Reemplazando los valores usados en el método de Frens, donde un volumen de 50 mL de  $\text{AgNO}_3$  1 mM reaccionó con 500  $\mu\text{L}$  de citrato de sodio 0.189 M, se obtiene una concentración de 0.107 g Ag/L. Para el método regular, donde se usó un volumen de 50 mL de citrato de sodio 7mM en conjunto con 8.8 mL de  $\text{AgNO}_3$  2 Mm, se obtiene una concentración de 0.032 g Ag/L. Estos resultados concuerdan con la diferencia de la intensidad de coloración mostrada en la *Figura 14*, donde a una mayor intensidad de color denota una mayor concentración de NPs (Paramelle et al., 2014). Así, para el método de Frens que presenta un color amarillo más intenso se obtuvo una concentración de AgNPs de más de tres veces mayor que el método regular.

#### 4.1.2.2. Espectroscopía UV-Vis

La *Figura 15* muestra los espectros UV-Vis obtenidos con un NanoDrop ND-1000 de las AgNPs sintetizadas mediante los métodos de Frens y regular. Así mismo, la *Tabla 7* resume los datos espectrofotométricos de absorbancia, longitud de onda máxima y FWHM obtenidos para cada método de síntesis.



*Figura 15.* Espectros UV-Vis de las AgNPs sintetizadas mediante los métodos Frens y regular.

Tabla 7

*Comparación de los datos espectrofotométricos obtenidos por cada método de síntesis*

	Absorbancia (unid. abs.)	$\lambda$ máx (nm)	FWHM (nm)
Método de Frens	$0.9 \pm 0.05$	$418 \pm 3$	$116 \pm 5$
Método regular	$0.2 \pm 0.05$	$427 \pm 7$	$123 \pm 7$

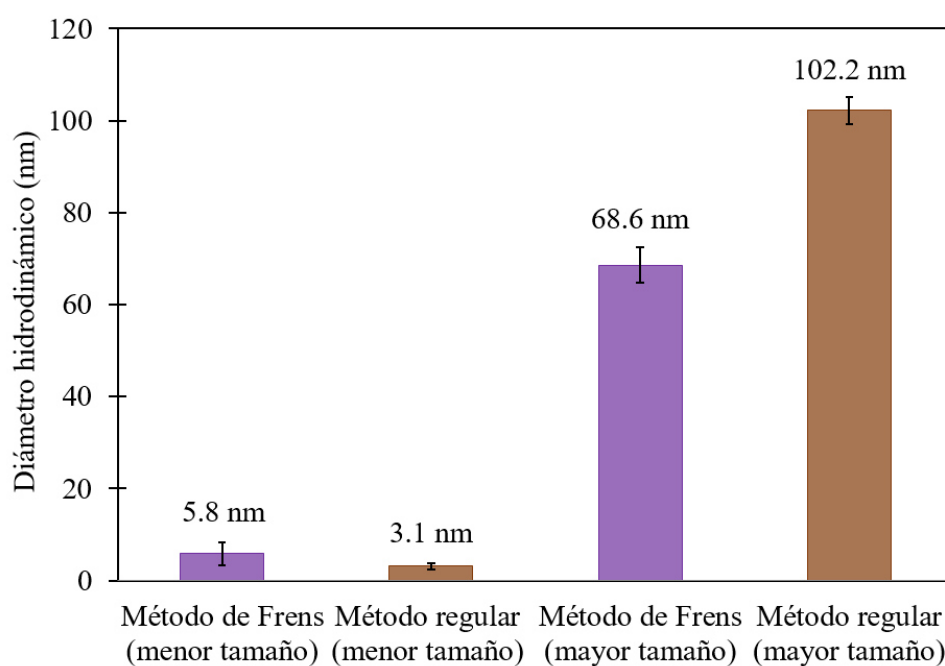
Debido a la mayor intensidad de absorbancia del espectro de las AgNPs sintetizadas mediante el método de Frens mostrado en la *Figura 15* se infiere que el método de Frens produce AgNPs en concentraciones mayores que el método regular (Paramelle et al., 2014). Además, como se muestra en la *Tabla 7*, el método de Frens produce AgNPs a una longitud de onda máxima de  $418 \pm 3$  nm, a diferencia de las AgNPs del método regular que se ubican a los  $427 \pm 7$  nm. Esta menor longitud de onda hace referencia a la síntesis de AgNPs de menor diámetro donde la longitud de onda máxima alrededor de los 420.9 nm está asociada a AgNPs de 50 nm de diámetro, mientras que para los alrededores de los 431.5 nm a AgNPs de 60 nm de diámetro (Paramelle et al., 2014). Por otro lado, el menor valor de FWHM que es relacionado a la dispersión de tamaño de las AgNPs (Šileikaite et al., 2009) denota que las AgNPs sintetizadas mediante el método de Frens presentan una menor dispersión de tamaño que las AgNPs sintetizadas mediante el método regular.

El espectro de las AgNPs sintetizadas mediante los dos métodos mostrado en la *Figura 15* indica la presencia de una distribución bimodal del tamaño de partículas en los sistemas lo cual es atribuible a la presencia de dos picos en el espectro, un pico centrado alrededor de los 350 nm y otro, alrededor de los 420 nm. Según Agnihotri, Mukherji y Mukherji (2014) y Zheng et al. (2001), mientras el primer pico es

relacionado a AgNPs con diámetros menores de 10 nm, el segundo pico a AgNPs con diámetros de 50 nm. En orden de confirmar los tamaños de las AgNPs obtenidas estas fueron caracterizadas mediante DLS.

#### 4.1.2.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La *Figura 16* muestra los diámetros hidrodinámicos de las AgNPs obtenidas por cada método de síntesis donde para cada método se obtuvo dos grupos de tamaños. Como se



*Figura 16.* Radio de las AgNPs sintetizadas mediante los métodos de Frens y regular.

observa en la figura, con el método de Frens se obtuvieron dos distribuciones de tamaños de AgNPs centrados alrededor de los 5.8 nm y 68.6 nm, mientras que para las AgNPs sintetizadas por el método regular se obtuvieron dos distribuciones de tamaños centrados alrededor de los 3.1 nm y 102.2 nm. Estos valores coinciden con la presencia de los dos picos reportados en el espectro UV-Vis de la *Figura 15* y la mayor diferencia

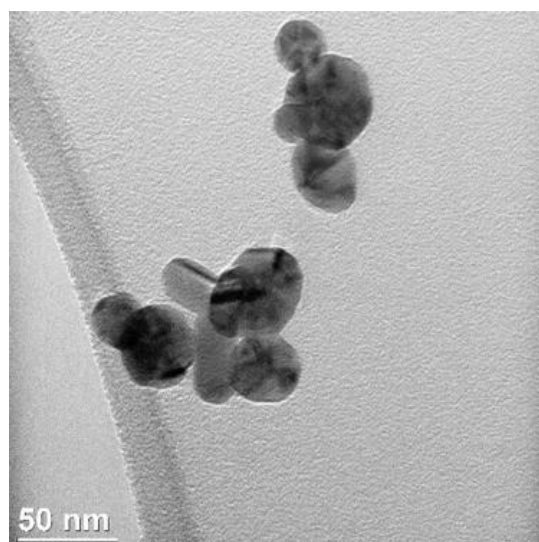
de tamaños obtenidos mediante el método regular concuerda con el mayor valor de FWHM obtenido en el espectro UV-Vis y reportado en la *Tabla 7*.

#### **4.1.2.4. Potencial zeta**

La estabilidad a largo plazo de las AgNPs se evaluó mediante el valor de potencial zeta. Como es reportado por Saeb et al. (2014) y Bhattacharjee (2016) esta técnica sólo evalúa los efectos electrostáticos e indica la carga superficial de las NPs. Así, las NPs con altos valores de zeta potencial absolutos presentan mayores fuerzas de repulsión evitando su agregación y posterior floculación, siendo de esta manera más estables. Mientras que las NPs con bajos valores de potencial zeta absolutos ocurre el efecto contrario. De esta manera, las NPs con potenciales zeta de  $\pm 0-10$  mV,  $\pm 10-20$  mV y  $\pm 20-30$  mV son consideradas altamente inestables, relativamente estables y moderadamente estables, respectivamente. Dado que las AgNPs sintetizadas mediante el método regular presentaron un valor de zeta potencial de  $-1.3 \pm 0.3$  mV, mientras que para el método de Frens se obtuvo un valor de  $-27.7 \pm 0.3$  mV, el análisis de los valores de zeta potencial obtenidos indica que las suspensiones de AgNPs preparados mediante el método de Frens son más estables.

#### **4.1.2.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

Como se muestra en la micrografía de la *Figura 17*, las AgNPs más grandes presentaron un diámetro alrededor de los 50 nm confirmando el análisis realizado mediante espectroscopia UV-Vis y DLS. Además, estas AgNPs presentaron una forma cilíndrica y esférica.



*Figura 17.* Micrografía mediante TEM de las AgNPs sintetizadas mediante Frens.

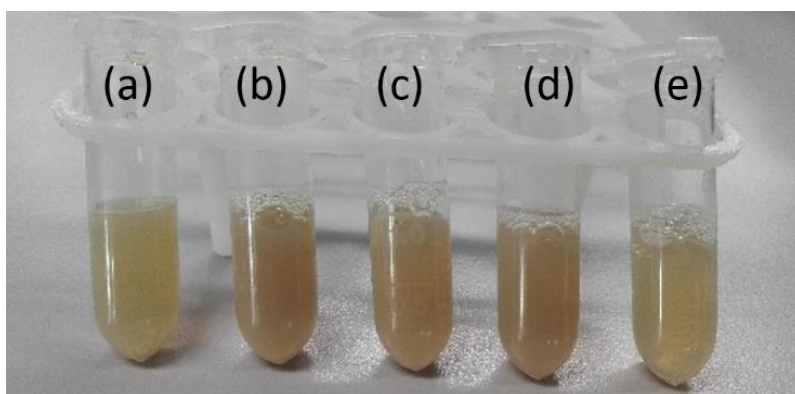
#### 4.2. Estudio de las nanopartículas de plata en interacción con BSA

Las AgNPs interaccionaron con diferentes concentraciones de BSA como se resume en la *Tabla 8*. Las soluciones continuaron mostrando un color amarillento característico de las AgNPs, pero como se muestra en la *Figura 18* una coloración ligeramente marrón se observó dependiendo de las cantidades de BSA en interacción. Estos cambios se evaluaron mediante espectroscopía UV-Vis, DLS, Zeta Potencial y TEM.

Tabla 8

*Concentraciones y relaciones molares de AgNPs y BSA*

Concentración de BSA (mg/mL)	Concentración de AgNPs (mM)	Número de moles de BSA	Número de moles de AgNPs	Relación molar BSA:AgNPs
8.59	33.4	$1.26 \times 10^{-7}$	$1.67 \times 10^{-5}$	0.008
19.12		$2.81 \times 10^{-7}$		0.017
20.20		$2.97 \times 10^{-7}$		0.018
52.00		$7.64 \times 10^{-7}$		0.046
65.00		$9.56 \times 10^{-7}$		0.057



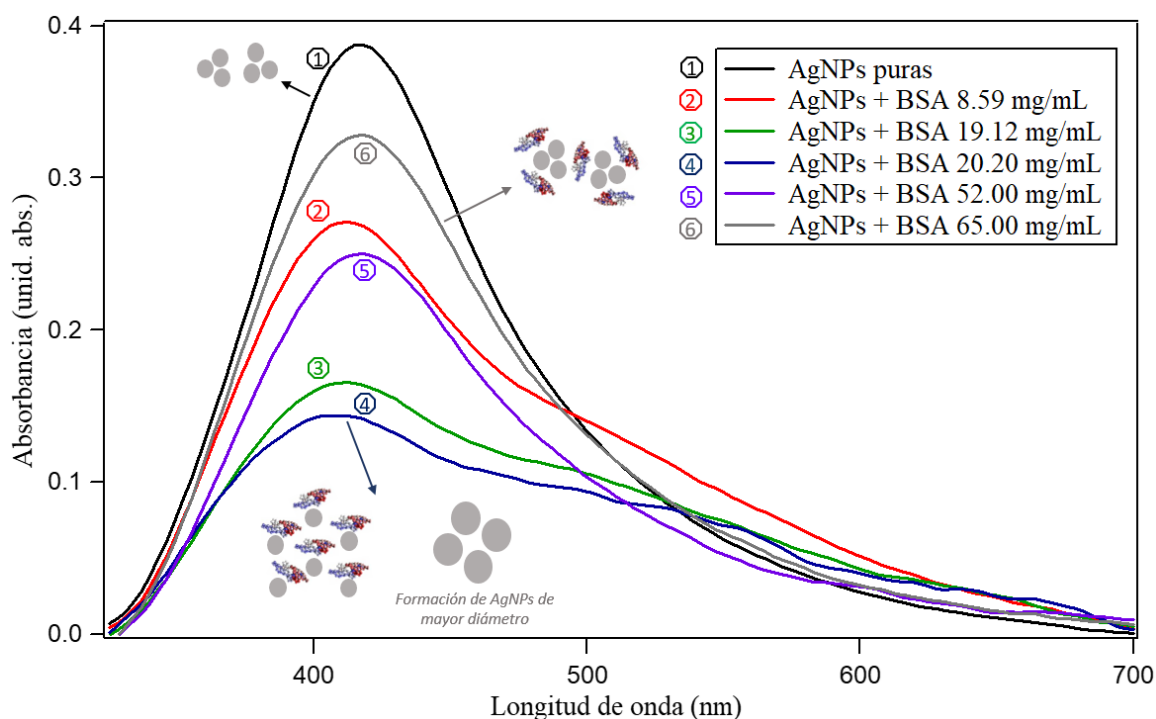
*Figura 18.* AgNPs en interacción con (a) 0, (b) 8.59, (c) 19.12, (d) 20.20 y (e) 52.00 mg de BSA.

Las burbujas son producidas durante la agitación el BSA no disuelto.

#### 4.2.1. Espectroscopía UV-Vis

En la *Figura 19* se muestra el espectro UV-Vis de las AgNPs puras y después de su interacción con BSA acorde a la *Tabla 8*. Para las AgNPs puras se obtuvo una longitud de onda máxima alrededor de los 420 nm (espectro 1 de la *Figura 19*). Además, para relaciones molares menores a 0.018 (espectros 2-4 de la *Figura 19*) se observó un decrecimiento de la intensidad de absorbancia a la misma longitud de onda y la aparición de un “hombro” por encima de los 500 nm lo cual es asociado a la formación de AgNPs de mayor tamaño (Paramelle et al., 2014). Estos cambios fueron también visualmente perceptibles como se muestra en la *Figura 18* (muestras b y c) donde la ligera coloración marrón es asociada a una mayor distribución de tamaños de AgNPs (Khan, Tareq, Hossen & Roki, 2018). Por otro lado, se observó un cambio en la forma del espectro alrededor de los 400 nm, sin embargo, el origen de estos cambios no fue elucidado. A concentraciones más altas de BSA (espectros 5-6 de la *Figura 19*) también se observó una disminución de la intensidad de absorbancia de las AgNPs, aunque no la formación de un hombro por encima de los 500 nm lo que sugiere que a mayores

concentraciones de BSA no existe coalescencia de las AgNPs y, por lo tanto, crecimiento de estas.



*Figura 19.* Espectro UV-Vis de las 6 muestras de AgNPs en interacción con diferentes concentraciones de BSA. Posible esquema de interacción donde a menores concentraciones de BSA hay un desestabilización de las AgNPs y se promueve la formación de un hombro alrededor de los 500 nm, mientras que a menores de concentración de BSA no hay una desestabilización de las AgNPs.

La *Figura 20A* muestra los cambios de longitud de onda máxima y absorbancia en relación a diferentes radios molares BSA:AgNPs. Como se observa en la figura, existen dos tendencias: mientras que para concentraciones de BSA menores de 20.20 mg/mL, el incremento de la relación molar BSA:AgNPs resulta en un *blue shift* (corrimiento a menores longitudes de onda) y una disminución en la absorbancia, para concentraciones de BSA mayores de 20.20 mg/mL ocurre el efecto inverso, es decir, hay un aumento de



los valores espectrofotométricos hacia la longitud de onda máxima y absorbancia originales. Dado que el experimento es llevado a pH 7, un valor de pH mayor a el punto isoeléctrico de BSA que es pH 4.7 (Salis et al., 2011), el BSA presenta una carga total negativa. Según Ravindran, Chandran y Khan (2013), los cambios tanto en absorbancia y longitud de onda máxima mostrados en la *Figura 20A* tienen origen en la interacción entre las AgNPs y los grupos funcionales cargados negativamente del BSA a través de fuerzas electrostáticas y de Van der Waals, donde el BSA desplaza los citratos que originalmente estabilizaban a las AgNPs. En el presente trabajo se propone que el desplazamiento del citrato puede llevarse a cabo incluso en presencia de pequeñas concentraciones de BSA, cuales no son suficientes para estabilizar a todas las AgNPs resultando así en su coalescencia. Además, es posible que el cambio de la absorbancia de las AgNPs en interacción con BSA sea debido a los cambios del efecto plasmónico en la superficie de las NPs. Por otro lado, según Banerjee y Das (2013) los efectos *blue shift* y *red shift* (corrimiento a mayores longitudes de onda) de las AgNPs en interacción con proteínas es dependiente de la concentración de la proteína respecto a la cantidad de NPs. Por último, para una concentración de 20.20 mg/mL de BSA o una relación molar de 0.018 se obtuvo la menor intensidad de absorbancia y el punto común entre las dos tendencias descritas, lo que, según Banerjee y Das (2013), Karthiga, Chandrasekaran y Mukherjee (2017) y Mariam, Dongre y Kothari (2011), denotaría que se logra la interacción entre el BSA sin ningún desplegamiento y las AgNPs.

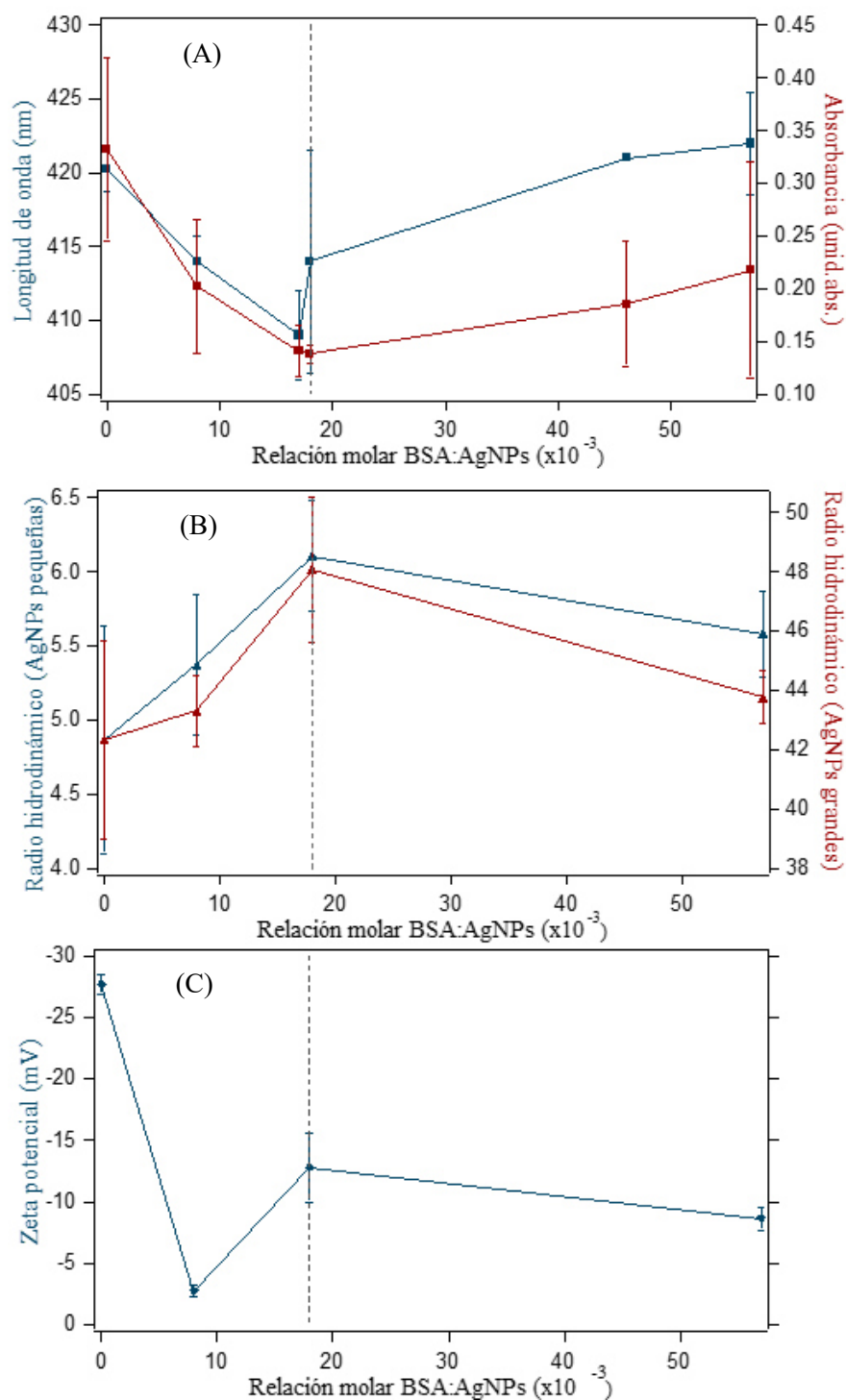


Figura 20. (A) Longitud de onda máxima y absorbancia en función a las relación molar BSA:AgNPs, (B) Radios hidrodinámicos de los dos tamaños de las AgNPs en interacción con 8.59, 20.20 y 65.00 mg de BSA y (C) Zeta potencial en relación al radio molar BSA:AgNPs.

#### 4.2.2. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Los radios hidrodinámicos promedios y desviaciones estandares de las AgNPs puras y en interacción con BSA obtenidos mediante DLS son mostrados en la *Figura 20B*. Se observa que las AgNPs puras presentaron dos radios hidrodinámicos distintos de  $4.8 \pm 0.7$  nm (90.75 % de masa) y de  $42.3 \pm 3.3$  nm (9.25 % de masa) con un índice de polidispersidad de 0.3. Por esta razón, se evaluaron los cambios para los dos tamaños de AgNPs en interacción con 8.59, 20.20 y 65.00 mg BSA los cuales representan relaciones molares BSA:AgNPs de 0.008, 0.018 y 0.57, respectivamente. En ambos casos, se encontró un mayor radio hidrodinámico para las AgNPs en interacción con 20.20 mg de BSA, lo que confirma lo descrito en el apartado anterior que a esta concentración el BSA sin ningún tipo de desplegamiento interacciona con las AgNPs. Por otro lado, para concentraciones menor de 20.20 mg BSA se observa un crecimiento de radio hidrodinámico lo que confirma lo observado mediante espectroscopía UV-Vis (*Figura 19*). Por último, para cantidades superiores a 65.00 mg de BSA, se propone que el aumento de aglomeración disminuye la interacción con BSA conduciendo a un radio hidrodinámico más bajo.

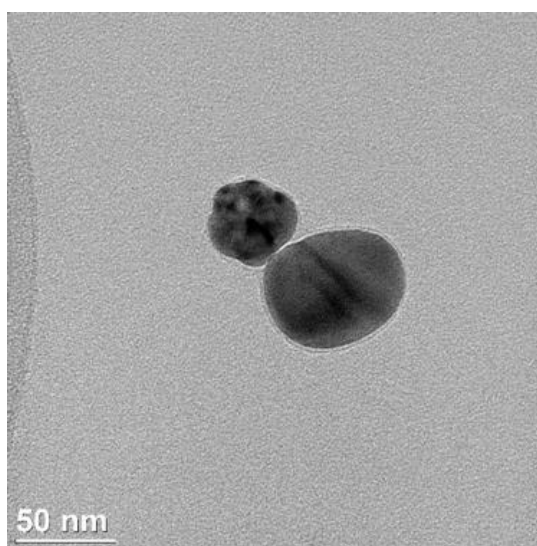
#### 4.2.3. Potencial zeta

De acuerdo a lo propuesto en la sección 4.2.1. (*Espectroscopía UV-Vis*) una pequeña concentración de BSA es capaz de desplazar a los citratos que recubren a las AgNPs y de esta manera desestabilizarlas. Los valores de zeta potencial mostrados en la *Figura 20C* concuerdan con esta hipótesis donde a pequeñas concentraciones de BSA (8.59 mg/mL) se observa un decrecimiento substancial del zeta potencial de las AgNPs. Por otro lado, a mayores concentraciones de BSA también se obtiene una desestabilización del sistema, pero en menor medida. Las AgNPs puras mostraron tener una estabilidad

moderada (entre -20 y -30 mV), mientras que las AgNPs en interacción con BSA presentaron un zeta potencial asociado a una alta inestabilidad de NPs (entre 0 y -10 mV) (Bhattacharjee, 2016). Es importante destacar que el potencial zeta solo toma en consideración los efectos electrostáticos, aunque en este caso las interacciones de Van der Waals deben ser lo suficientemente fuertes como para estabilizar a las AgNPs (Bhattacharjee, 2016)(Ravindran, Chandran & Khan, 2013). Como es reportado por Saeb et al. (2014), la estabilidad de las AgNPs expuestas a sistemas biológicos no concordaron a la estabilidad predicha mediante zeta potencial, donde más ensayos a nivel bioquímico y molecular fueron necesarios para entender dicho fenómeno.

#### 4.2.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Dado que la mayor estabilidad de las AgNPs corresponde a una interacción con 20.20 mg de BSA, se realizó la medición en TEM para esta concentración, tal como se muestra en la *Figura 21*. De acuerdo con nuestras mediciones espectroscópicas, se observa que en presencia de BSA las AgNPs están más dispersas.



*Figura 21.* TEM de las AgNPs en interacción con 20.20 mg de BSA.

### 4.3. Estudio de las nanopartículas de plata en interacción con rh EGF

#### 4.3.1. En el medio de síntesis

Las AgNPs interaccionaron con diferentes cantidades de rh EGF, las masas de rh EGF usadas en la síntesis y en interacción con las AgNPs se muestra en la *Tabla 9*, mientras en la *Tabla 10* se resume los número de moles de rh EGF y AgNPs en interacción. Bajo las condiciones del medio de síntesis, estas interacciones se evaluaron mediante espectroscopía UV-Vis, FTIR y TEM.

Tabla 9

*Nombre de las muestras y masas de rh EGF usados*

Nombre de la muestra	Masa rh EGF usada en la síntesis (ng)	Masa rh EGF en interacción con las AgNPs (ng)
AgNPs 1000 ng EGF	1061.25	1060.25
AgNPs 2500 ng EGF	2476.25	2456.25
AgNPs 4000 ng EGF	3891.25	3667.25

Tabla 10

*Concentraciones y relaciones molares de AgNPs y rh EGF*

Nombre de la muestra	Número de moles de rh EGF en interacción	Número de moles de AgNPs	Relación molar rhEGF:AgNPs
AgNPs 1000 ng EGF	$1.06 \times 10^{-10}$		$0.63 \times 10^{-5}$
AgNPs 2500 ng EGF	$2.45 \times 10^{-10}$	$1.67 \times 10^{-5}$	$1.47 \times 10^{-5}$
AgNPs 4000 ng EGF	$3.66 \times 10^{-10}$		$2.20 \times 10^{-5}$

#### 4.3.1.1. Espectroscopía UV-Vis

En la *Figura 22* se muestra el espectro UV-Vis de las AgNPs puras y después de su interacción con rh EGF de acuerdo a la *Tabla 10*. La *Tabla 11* resume los datos espectrofotométricos obtenidos a partir del espectro. Según lo reportado en la sección

4.2.1. (*Espectroscopía UV-Vis*) y lo reportado por Shrivastava y Dash (2010), Mariam, Dongre y Kothari (2011), Wang et al. (2017), Dasgupta et al. (2016), Banerjee y Das (2013), entre otros, los espectros UV-Vis de las AgNPs en interacción con proteínas es dependiente de la concentración de la proteína con la que interacciona independientemente de su masa molecular o su estructura conformacional. Además, el tipo de interacción con las NPs, el estado de agregación y tamaño de las NPs también dependerá directamente de la cantidad de proteína. Las AgNPs en interacción con una creciente concentración de proteínas mostrarán el efecto “*dip and rise*” (frase en inglés que significa “disminución e incremento”) de la intensidad de absorbancia en el espectro UV-Vis, este efecto es claramente observado en lo descrito en la sección 4.2.1. (*Espectroscopía UV-Vis*) para la interacción de las AgNPs con BSA. Sin embargo, como es observado en la *Figura 22*, para el caso de las AgNPs con rh EGF solo es observado el efecto de disminución de la absorbancia, debido a que los ensayos fueron realizados solo en un rango bajo y cercano de concentración de rh EGF. Esto es fácilmente observable en la comparación de las relaciones molares de la *Tabla 8* y *Tabla 10*. Según lo detallado por Banerjee y Das (2013) quienes describen el aspecto teórico de la dependencia de la intensidad de absorbancia a la longitud de onda y tamaño de las NPs, se establece que un incremento del radio de la NP debido a su interacción con cantidades bajas de proteínas (se asume una cantidad menor a 1  $\mu\text{M}$ ) conducirá a un efecto *red shift* de la longitud de onda acompañado de un decrecimiento de la absorbancia; sin embargo, una variación de tamaño de NP menor de 10 nm a causa de la interacción de la NP con una cantidad de proteína en un rango de 1 a 30  $\mu\text{M}$  conduce a un decrecimiento de la intensidad de absorbancia sin cambios significativos de la longitud de onda. Estas predicciones son corroboradas con los resultados obtenidos,

donde los ensayos fueron realizados hasta una concentración de 0.8  $\mu\text{M}$  de rh EGF y como se observa en la *Figura 22* y *Tabla 11*, se obtuvo un *red shift* de 15 nm acompañado a una disminución de la absorbancia y un aumento del FWHM. Aunque las causas del aumento en el tamaño de la NPs por efecto de pequeñas concentraciones de proteínas no han sido totalmente definidas, se presume que debido a que el experimento se lleva a cabo a un pH 7, un valor de pH mayor a el punto isoeléctrico del rh EGF que es pH 4.43 (Kim, Lim, Lim, Kim & Jeong, 2014), el rh EGF presenta una carga total negativa e interacciona con las AgNPs mediante fuerzas electrostáticas, Van der Waals (Ravindran, Chandran & Khan, 2013) y sobre todo interacciones hidrofóbicas (Banerjee & Das, 2013), al igual que en el caso del BSA, se propone que a incluso en presencia de pequeñas concentraciones, el rh EGF desplaza a los citratos que originalmente estabilizaban a las AgNPs, cuales no son suficientes para estabilizar a todas las AgNPs resultando así en su coalescencia. Este proceso explicaría también la mayor distribución de tamaño denotada por el aumento del FWHM a mayor presencia de proteína (Šileikaite et al., 2009). Por otro lado, según Zhou et al. (2013) el *red shift* obtenido en la espectro mostrado en la *Figura 22* evidencia la adhesión del rh EGF a la superficie de las AgNPs, confirmando la formación de las AgNPs en interacción con rh EGF. Otro aspecto a resaltar es que los valores de longitud de onda máxima y FWHM de las AgNPs no varían significativamente en presencia de cualquiera de las cantidades de rh EGF. Dada la diferencia que en el caso de las AgNPs en interacción con BSA se obtuvo un efecto inicial de *blue shift*, mientras que en el caso de la interacción con rh EGF se obtuvo un *red shift*, esta podría ser explicada por la diferencia de los índices de refracción de cada medio (Castillo, 2005), aunque se requiere una mayor caracterización para elucidar este fenómeno.

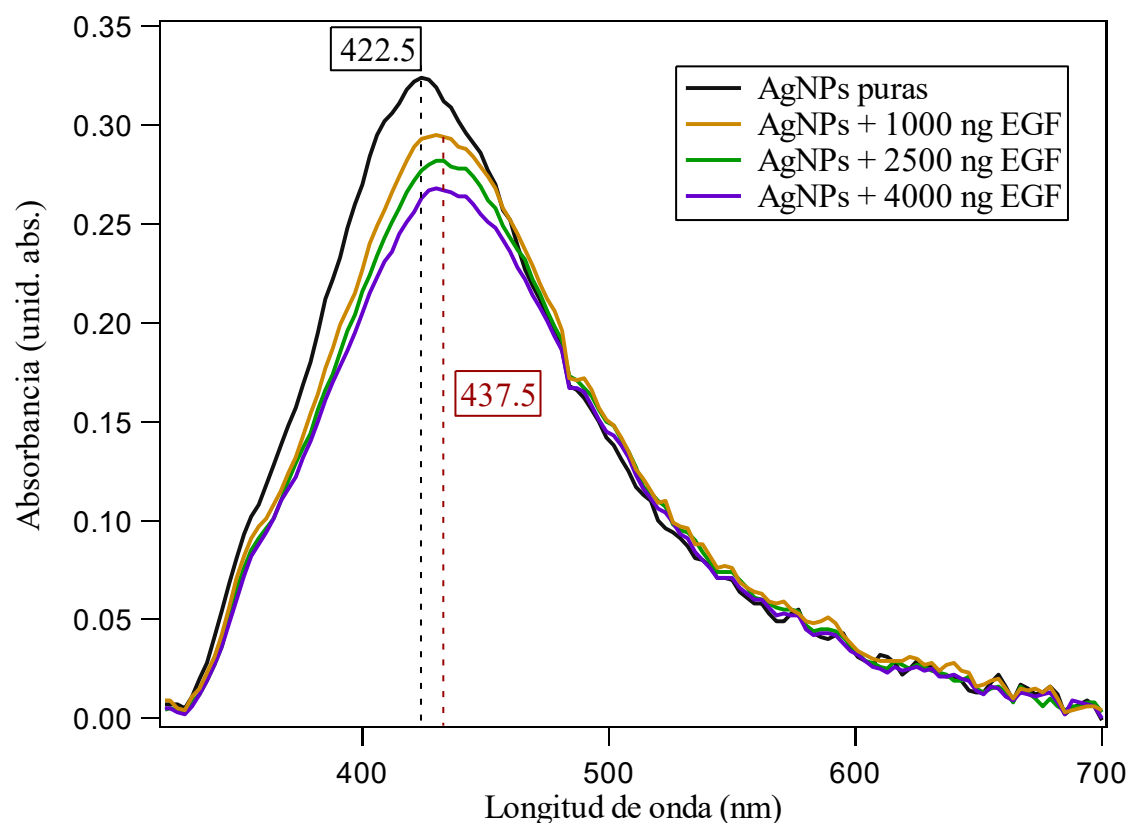


Figura 22. Espectros UV-Vis de las AgNPs puras y en interacción con rh EGF.

Tabla 11

*Datos espectrofotométricos de las AgNPs en interacción con rh EGF*

	Absorbancia (unid. abs.)	$\lambda$ máx (nm)	FWHM (nm)
AgNPs puras	$0.324 \pm 0.005$	$422.5 \pm 1.5$	$111 \pm 3$
AgNPs 1000 ng EGF	$0.295 \pm 0.007$	$437.5 \pm 4.0$	$126 \pm 3$
AgNPs 2500 ng EGF	$0.282 \pm 0.005$	$437.5 \pm 2.5$	123
AgNPs 4000 ng EGF	$0.268 \pm 0.001$	$437.5 \pm 4.5$	126

La estabilidad de las AgNPs se evaluó mediante espectroscopía UV-Vis hasta los 7 días posteriores a su síntesis como se muestra en la Figura 23. Se obtuvo una disminución de alrededor de 0.02 unidades de absorbancia para todas las muestras manteniéndose así la tendencia mostrada en la Figura 23 y para el caso de las AgNPs



con rh EGF se obtuvo una longitud de onda máxima de 439 nm (1.5 nm más al promedio inicial). Debido a que la variación de los parámetros no fue significativa se puede afirmar que las AgNPs en interacción con rh EGF fueron estables hasta a 7 días de su síntesis (Ray et al., 2015).

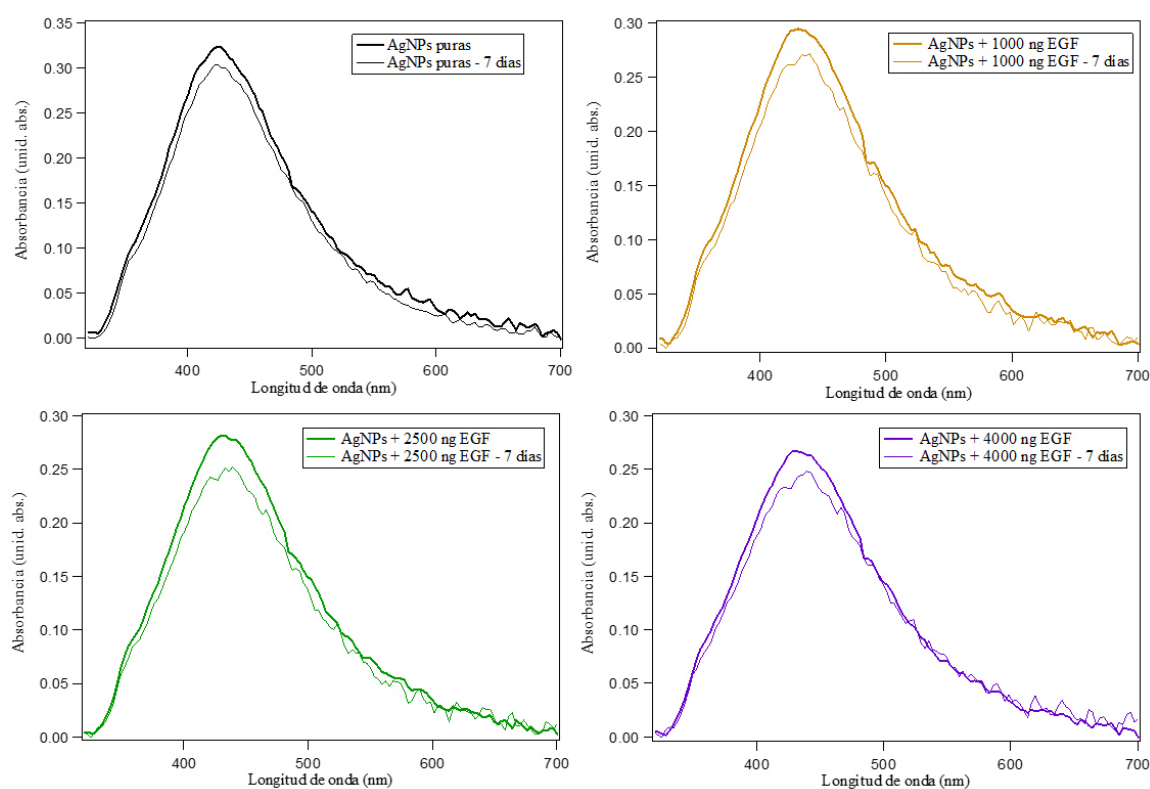


Figura 23. Espectros UV-Vis de las AgNPs puras y en interacción con rh EGF 7 días después de sus síntesis.

#### 4.3.1.2. Espectroscopía FTIR

Como fue descrito en la sección 1.2.2.2. (*Factor de crecimiento epidermal*), el rh EGF contiene 3 puentes bisulfuros (conformación parte de la estructura terciaria) cuales son fundamentales para la afinidad con el receptor (EGFR) a cual se enlaza a través del fragmento bucle-B (sitio específico de enlace, conformación parte de la estructura

secundaria), lograr la interacción del rh EGF a las AgNPs podría afectar estas estructuras por lo que es preciso la evaluación estructural del polipéptido en orden de evaluar su posible funcionalidad y eficacia de uso (Bhattacharjee et al., 2017)(Esquirol-Caussa et al., 2017)(Yang et al., 2004). Como es reportado por Yang et al. (2015), Garidel y Schott (2006), Fasasi, Mirjankar y Fasasi (2015), Kong y Yu (2007) y Sukumaran (2017) la evaluación mediante espectroscopía FTIR de la banda de la amida I ( $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ) constituye el método más usado para la evaluación de la estructura secundaria de proteínas y polipéptidos, esto debido a su mayor sensibilidad y factor vibracional originado de la vibración del estiramiento  $\text{C}=\text{O}$  (70–85%) acoplado en fase a la flexión del enlace  $\text{N-H}$  y el estiramiento del enlace  $\text{C-N}$ . Según Yang et al. (2004) y Bhattacharjee et al. (2017) las bandas en la región de la amida I para el rh EGF son las siguientes:  $1677$ ,  $1638$ ,  $1632$ ,  $1624$  y  $1613 \text{ cm}^{-1}$  para las láminas beta;  $1684$ ,  $1666$  y  $1660$  a las vueltas reversas;  $1654 \text{ cm}^{-1}$  a las estructuras bucle y  $1645 \text{ cm}^{-1}$  a los espirales azarosos. La *Figura 24* muestra la absorbancia para la región de la amida I de las AgNPs puras y en interacción con 1000, 2500 y 4000 ng de rh EGF, como se puede observar se detectaron bandas a los  $1681$ ,  $1666$ ,  $1649$ ,  $1635$  y  $1618 \text{ cm}^{-1}$ , debido a la sensibilidad del equipo Fourier IRTracer–100 FTIR y a la preparación de la muestra (Baker, Trevisan, Bassan, Bhargava & Butler, 2015) la cuál fue secada sobre papel aluminio y no sobre  $\text{BaF}_2$  o  $\text{CaF}_2$  (Bhattacharjee et al., 2017)(Baker et al., 2015) no se logró la nitidez esperada, obteniéndose que la banda a los  $1681 \text{ cm}^{-1}$  constituía el promedio de las bandas  $1677$  y  $1684 \text{ cm}^{-1}$  representando a las láminas beta y vueltas reversas, a los  $1666 \text{ cm}^{-1}$  solo a las vueltas reversas, a los  $1649 \text{ cm}^{-1}$  era el promedio de las bandas  $1654$  y  $1645 \text{ cm}^{-1}$  representando a los bucles

y espirales azarosos y a los  $1635\text{ cm}^{-1}$ , promedio de  $1638$  y  $1633\text{ cm}^{-1}$ , y a los  $1618\text{ cm}^{-1}$ , promedio de  $1624$  y  $1613\text{ cm}^{-1}$ , representan solo a las láminas beta.

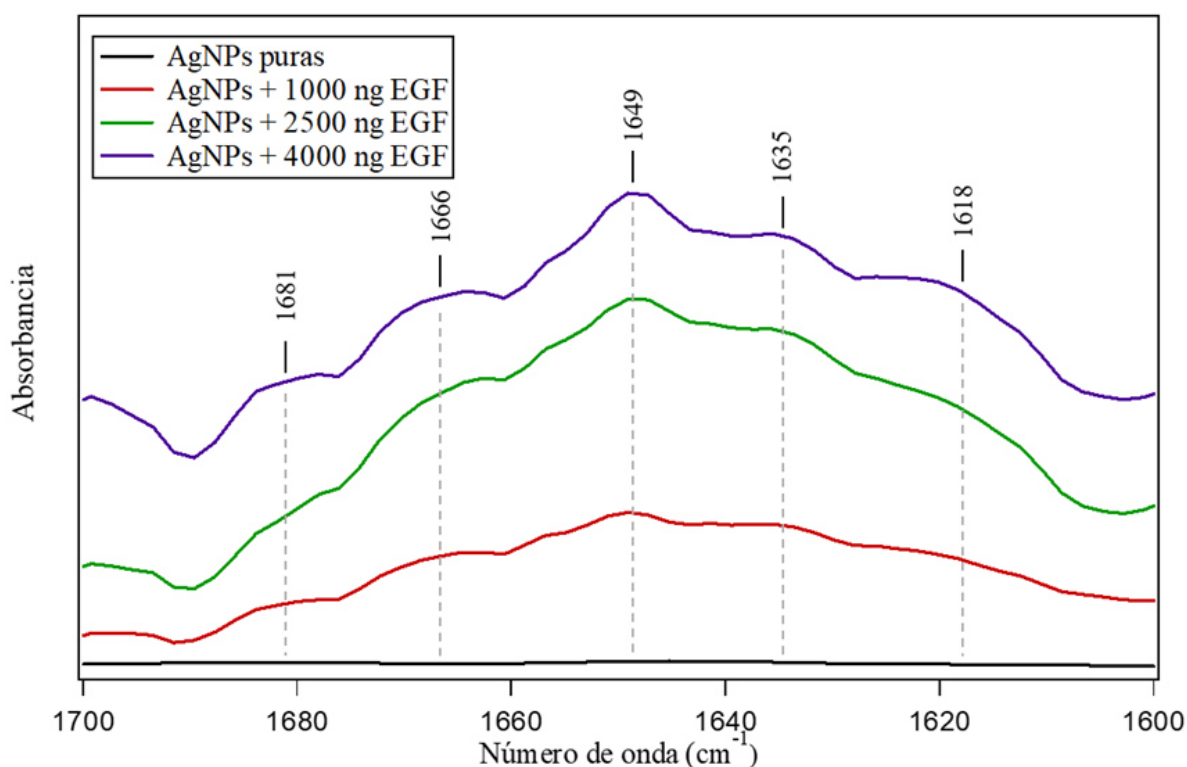


Figura 24. Espectros FTIR en la región amida I de las AgNPs puras y en interacción con rh EGF.

Para lograr una mejor resolución de las bandas se determinó la segunda derivada del espectro (Griffiths, 1981) a través de la función “*differentiate*” del software Igor Pro 3.13, la gráfica de la segunda derivada y su correlación a la estructura secundaria se muestra en la Figura 25. Como se muestra en la Figura 25 para las AgNPs puras no se obtuvo bandas en la región de la amida I, sin embargo, para se observa mayores intensidades de absorbancia de manera directamente proporcional a la cantidad de rh EGF en interacción con las AgNPs. Según lo reportado por Bhattacharjee et al. (2017) mientras mayor es la cantidad de rh EGF cargadas sobre las NPs se logra una mayor interacción rh EGF – rh EGF lo que ocasiona menos cambios en su

estructura, además, la mayor presencia de estructuras bucles y láminas beta indicarían una mejor adhesión del rh EGF a las NPs lo que origina una mayor estabilización de los polipéptidos.

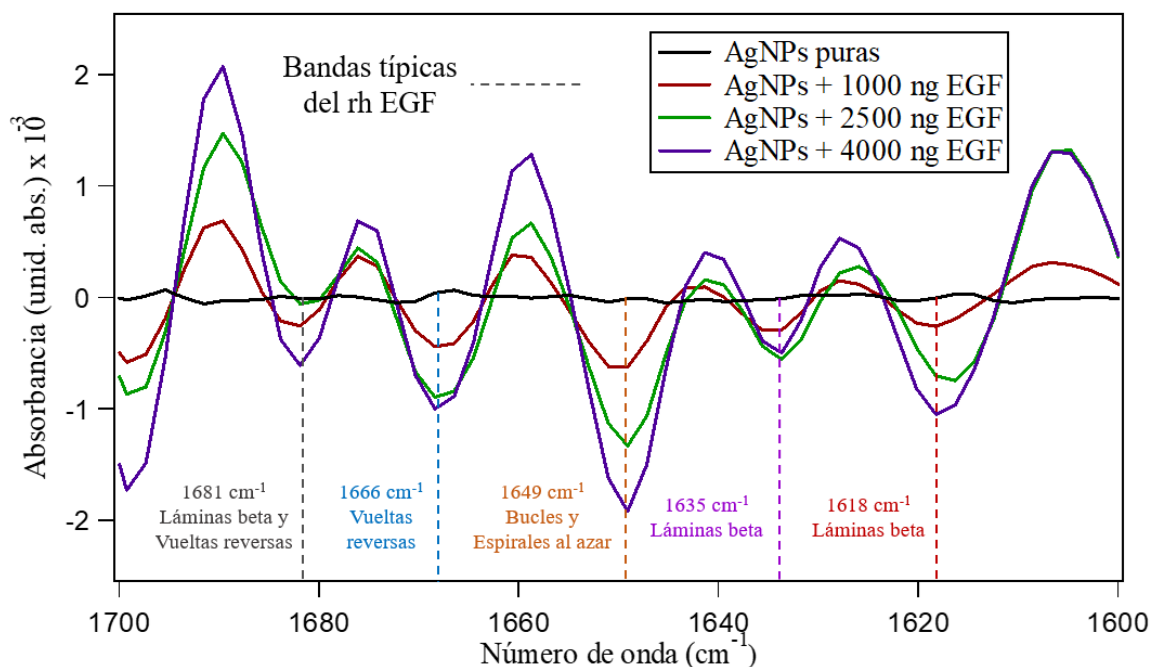


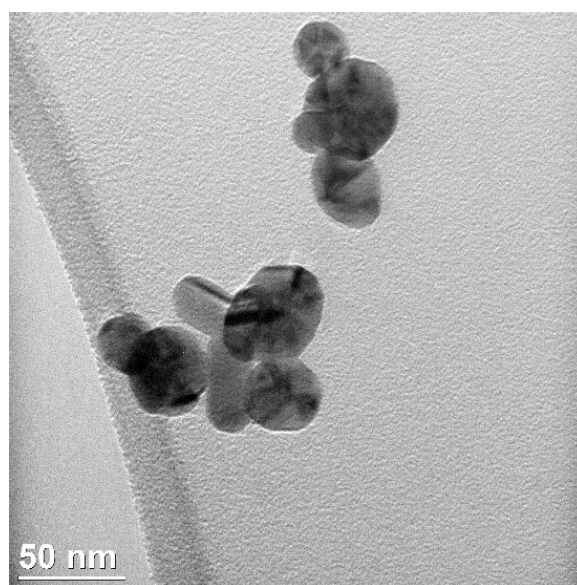
Figura 25. Segunda derivada de los espectros FTIR de diferentes cantidades de rh EGF.

En base a esta afirmación y a la Figura 25 se presume que los mayores valores de intensidad de absorbancia a cantidades mayores de rh EGF denotan la mayor presencia de estructuras bucles y láminas beta lo que indicaría la mayor estabilidad del rh EGF, menores cambios en su estructura y mejor adhesión a la superficie de las AgNPs. Por otro lado, debido a que las estructuras bucles son mantenidas durante la interacción, es posible que el fragmento bucle-B, sitio específico de enlace con el EGFR, mantenga su estabilidad y el polipéptido mantenga su actividad biológica. Por último, basado en un razonamiento inverso de lo descrito por Tetenbaum y Miller (2001) la estabilización de la estructura secundaria podría indicar que no ha habido modificaciones sustanciales en

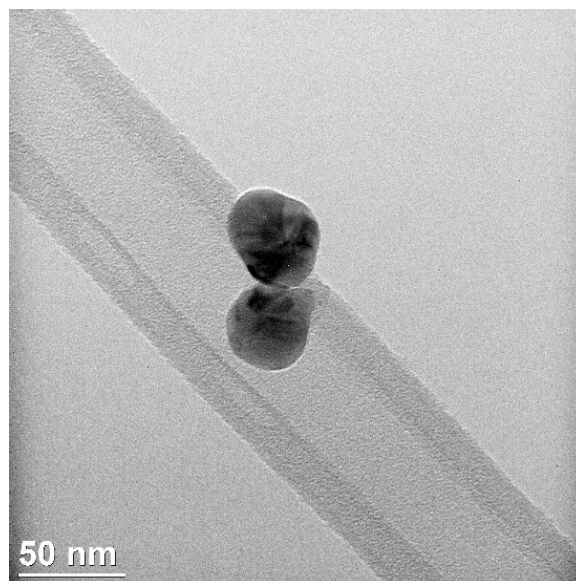
la estructura terciaria por lo que el puente bisulfuro necesario para lograr la afinidad entre el rh EGF y el EGFR tampoco podría haberse habido afectado, aunque se requieren más pruebas a nivel molecular y biológico para verificar estas afirmaciones.

#### 4.3.1.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

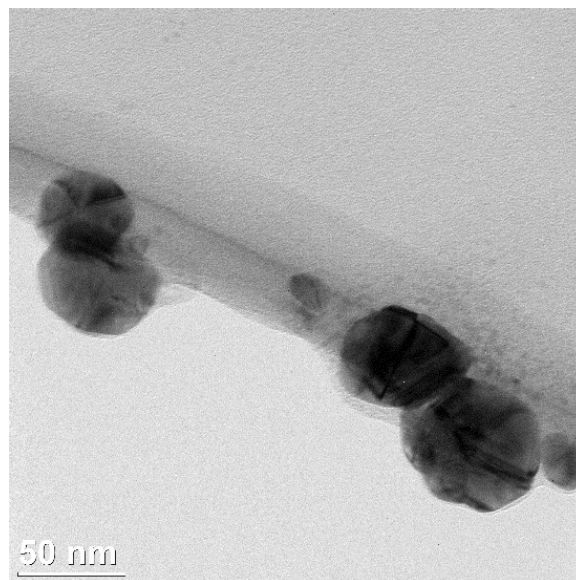
Según lo indicado por Zhou et al. (2013), la nebulosa que cubre las AgNPs en las *Figuras 27, 28 y 29* corresponden al rh EGF lo que indica su exitosa adhesión a las AgNPs. Además, como se observa a través de las *Figuras 27, 28 y 29*, el rh EGF no interacciona con todas las AgNPs, notándose con mayor claridad en las *Figuras 28 y 29* un incremento del tamaño de las AgNPs sin interacción con rh EGF. Este hecho es coherente a lo observado en el espectro UV-Vis de la *Figura 22* y lo planteado en la sección 4.3.1.1. (*Espectroscopía UV-Vis*). Por otro lado, las imágenes muestran la mayor aglomeración de rh EGF sobre la superficie de las AgNPs a mayores cantidades de rh EGF, lo que mejoraría la estabilidad del polipéptido y es correlativo a lo planteado en la sección 4.3.2.1. (*Espectroscopía FTIR*).



*Figura 26.* Micrografía mediante TEM de las AgNPs puras.



*Figura 27.* Micrografía mediante TEM de las AgNPs en interacción con 1000 ng de rh EGF.



*Figura 28.* Micrografía mediante TEM de las AgNPs en interacción con 2500 ng de rh EGF.

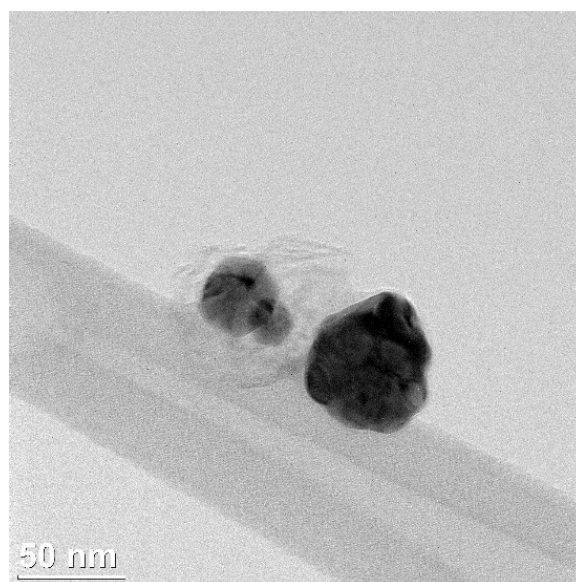


Figura 29. Micrografía mediante TEM de las AgNPs en interacción con 4000 ng de rh EGF.

#### 4.3.1.4. Eficiencia de carga

La eficiencia de carga se calculó mediante ensayo de ELISA rh EGF. Los valores de la curva estándar obtenidas mediante el software Microplate Manager® son mostrados en la *Tabla 12* y la ecuación de la recta en Ecuación 4.

Tabla 12

*Valores de la curva estándar del ensayo de ELISA rh EGF*

Concentración (rh EGF pg/mL)	1000	333.3	111.1	37.04	12.35	4.12	1.37	0
Absorbancia	2.369	2.394	2.388	2.324	2.300	1.004	1.049	0.071

$$\text{Concentración rh EGF (pg/mL)} = (A-D) / (1+(\text{Absorbancia}/C)^B)+D$$

Donde: A= 0,071, B= 1,072 (+/-0,331), C= 2,919 (+/-0,811) y D= 2,394

(Ecuación 4)

Se obtuvo valores de intensidad de absorbancia de 0.607, 1.775 y 2.300 para las AgNPs en interacción con 1061.25 ng (AgNPs 1000 ng EGF), 2476.25 ng (AgNPs 2500 ng

EGF) y 3891.25 ng (AgNPs 4000 ng EGF), respectivamente. Estos valores fueron reemplazados en la Ecuación 4 después de tomar en consideración las diluciones realizadas y se obtuvieron las siguientes cantidades de rh EGF en los sobrenadantes: 1 ng, 20 ng y 224 ng de rh EGF para las muestras AgNPs 1000 ng EGF, AgNPs 2500 ng EGF y AgNPs 4000 ng EGF, respectivamente. Estos valores y los porcentajes de eficiencia de carga para cada muestra son resumidos en la *Tabla 13*.

Tabla 13

*Porcentaje de eficiencia de carga de rh EGF sobre las AgNPs*

	Masa de EGF usada en la síntesis (ng)	Masa de EGF cargadas sobre las AgNPs (ng)	% Eficiencia de carga
AgNPs 1000 ng EGF	1061.25	1060.25	99.90
AgNPs 2500 ng EGF	2476.25	2456.25	99.20
AgNPs 4000 ng EGF	3891.25	3667.25	94.24

#### 4.3.2. En medio fisiológico

##### 4.3.2.1. Espectroscopía UV-Vis

Las AgNPs puras y en interacción con 1000 ng de rh EGF fueron expuestas a PBS 0.1%W/V BSA a 37°C para simular condiciones fisiológicas como es descrito en la sección 3.6.2. (*Liberación de rh EGF desde las AgNPs*). Las muestras finales se caracterizaron mediante espectroscopía UV-Vis para evaluar su estabilidad, los espectros son mostrados en la *Figura 30*. Las AgNPs puras presentaron una longitud de onda máxima de 424 nm, la misma longitud de onda máxima que en el medio de síntesis (véase *Tabla 11*) y una absorbancia de 0.07. Por otro lado, las AgNPs en interacción con 1000 ng de rh EGF mostraron una longitud de onda máxima de 439 nm la cual está en el rango previsto en la *Tabla 11* y una absorbancia de 0.12. La menor



absorbancia de las AgNPs y la formación de hombros entre los 500 y 700 nm indican la desestabilización de las AgNPs causada por la presencia del medio salino cual desestabiliza la bicapa eléctrica que protege a las NPs causando su coalescencia y la formación de AgNPs de mayores tamaños (Thanh, 2014). Por último, el aumento de absorbancia de las AgNPs en interacción con 1000 ng de rh EGF es contraria a la observada en el medio de síntesis y coherente a lo presentado en la discusión de la sección 4.3.1.1. (*Espectroscopía UV-Vis*) en la cual se propone que hay un desplazamiento del citrato que protege las AgNPs por parte del rh EGF protegiéndola de esta manera del medio salino y aumentando su estabilidad.

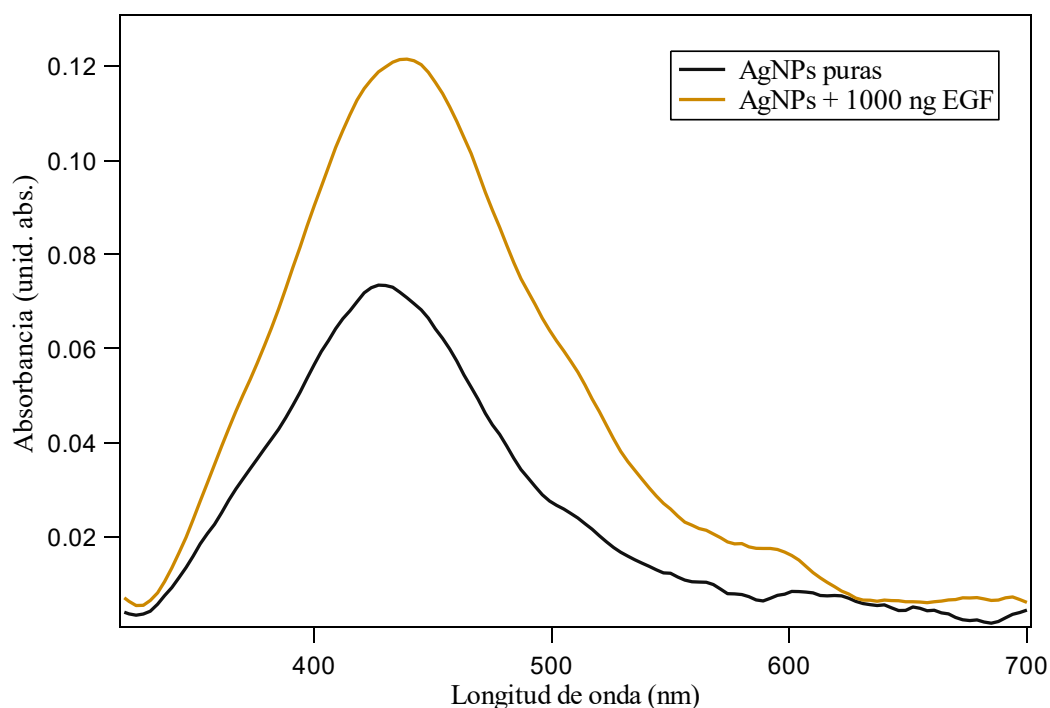


Figura 30. Espectro UV-Vis de las AgNPs puras y en interacción con rh EGF en medio fisiológico.

#### 4.3.2.2. Liberación de rh EGF desde las AgNPs

Las AgNPs en interacción con las diferentes cantidades de rh EGF fueron expuesta a una simulación del medio fisiológico como es detallado en la sección 3.6.2. (*Liberación*

de rh EGF desde las AgNPs). Los sobrenadantes a las 12, 24, 48 y 72 horas fueron evaluados mediante ELISA rh EGF. Los valores de absorbancia obtenidos son resumidos en la *Tabla 14* y los valores de las concentraciones en pg/mL en la *Tabla 15*.

Tabla 14

*Absorbancia del rh EGF liberado desde las AgNPs a diferentes tiempos*

	Tiempo			
	12 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.
AgNPs 1000 ng EGF	1.751	1.510	1.527	1.042
AgNPs 2500 ng EGF	1.498	1.293	0.915	0.138
AgNPs 4000 ng EGF	1.631	1.342	0.963	0.736

Tabla 15

*Concentración del rh EGF en pg/mL liberado desde las AgNPs a diferentes tiempos*

	Tiempo			
	12 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.
AgNPs 1000 ng EGF	7.1502	4.5986	4.7342	2.1435
AgNPs 2500 ng EGF	4.5058	3.2172	1.5534	0.1097
AgNPs 4000 ng EGF	5.6882	3.4822	1.8782	1.2448

Dado que para la medición de las muestras se realizaron las siguientes diluciones: 14  $\mu$ L de AgNPs 1000 ng EGF a un volumen final de 15 mL, 10  $\mu$ L de AgNPs 2500 ng EGF a un volumen final de 25 mL y 10  $\mu$ L de AgNPs 2500 ng EGF a un volumen final de 36 mL, se realizaron los cálculos respectivos para determinar la cantidad de rh EGF liberado para cada una de los tiempos los cuales son resumidos en la *Tabla 16*. Además, la *Figura 31* muestra la cantidad de rh EGF liberado a cada tiempo y la *Figura 32* la cantidad de rh EGF acumulado para cada tiempo. Como es observado como tendencia

general a mayor cantidad de rh EGF sobre las AgNPs se observa una mayor liberación del polipéptido.

Tabla 16

*Cantidad de rh EGF en ng liberado desde las AgNPs a diferentes tiempos*

	Tiempo			
	12 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.
AgNPs 1000 ng EGF	7.77	5.00	5.14	2.33
AgNPs 2500 ng EGF	11.66	8.32	6.33	0.28
AgNPs 4000 ng EGF	21.60	13.22	7.13	4.72

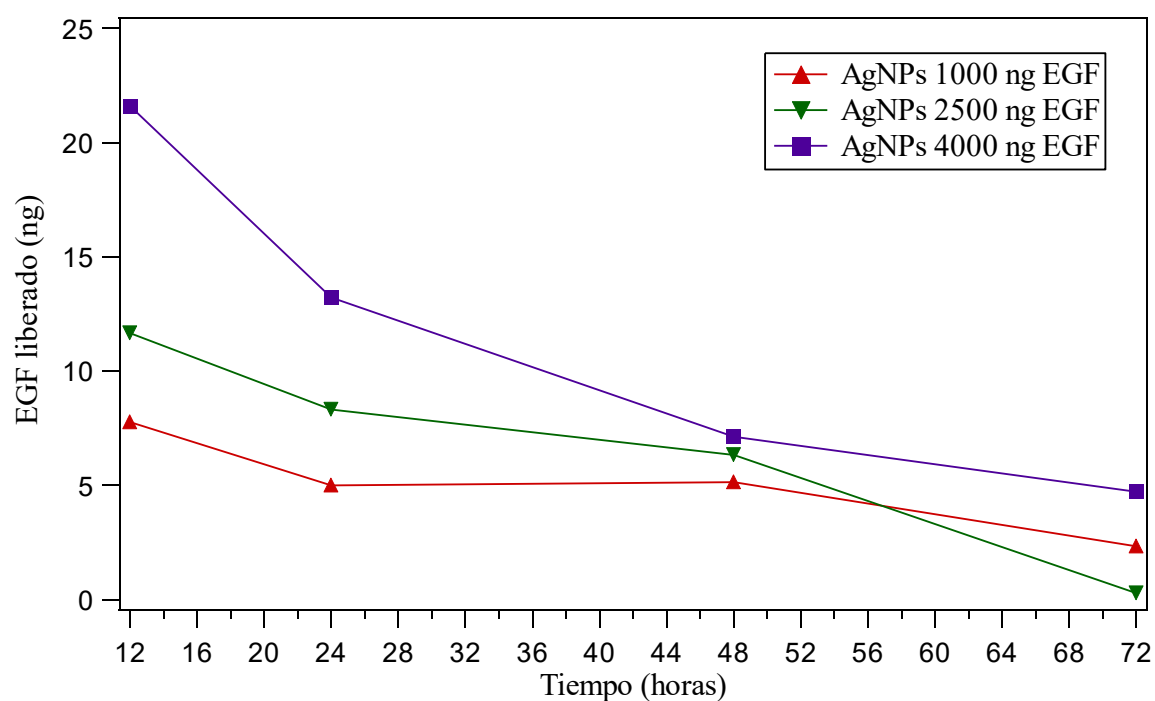


Figura 31. Liberación de rh EGF en ng desde las AgNPs a cada tiempo.

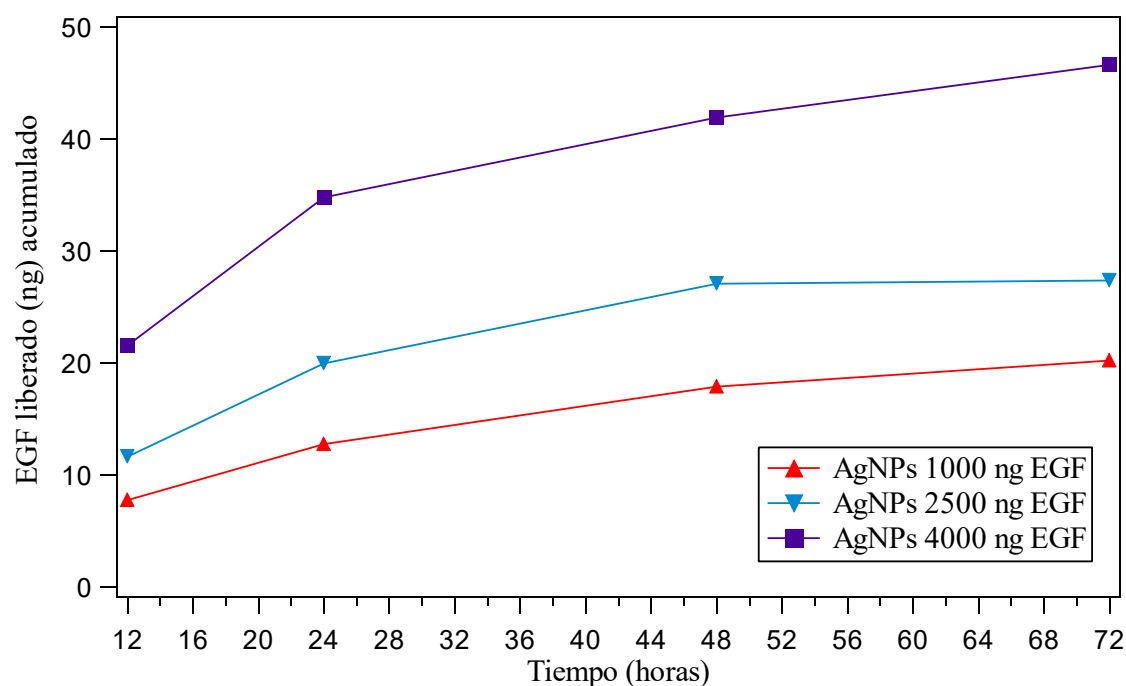


Figura 32. Acumulado de rh EGF en ng liberado desde las AgNPs a cada tiempo.

#### 4.4. Evaluación de la actividad antibacterial de AgNPs en interacción con rh EGF

##### 4.4.1. AgNPs con diferentes cantidades de rh EGF bajo el medio de síntesis

En la Figura 33 se muestra la densidad óptica a 600 nm (OD600) de *Escherichia coli* en presencia de 50 ug/mL de las Ag NPs puras y en interacción con 1000, 2500 y 4000 ng de rh EGF desde las 0 hasta las 24 horas. Como se puede observar no hay una diferencia de actividad antibacterial significativa contra *Escherichia coli* entre las AgNPs puras y las AgNPs en interacción con 1000 y 2500 ng de rh EGF, sin embargo, se denota una disminución de la actividad antibacterial cuando las NPs están cargadas con 4000 ng rh EGF. Según lo descrito por Gnanadhas et al. (2013) y Zhao et al. (2011) se puede afirmar que la menor actividad antibacterial de las AgNPs 4000 ng EGF es debido al mayor recubrimiento del rh EGF sobre las AgNPs, lo que impide la mayor liberación de los iones  $\text{Ag}^+$  debido a su interacción con el polipéptido disminuyendo su capacidad antibacterial.

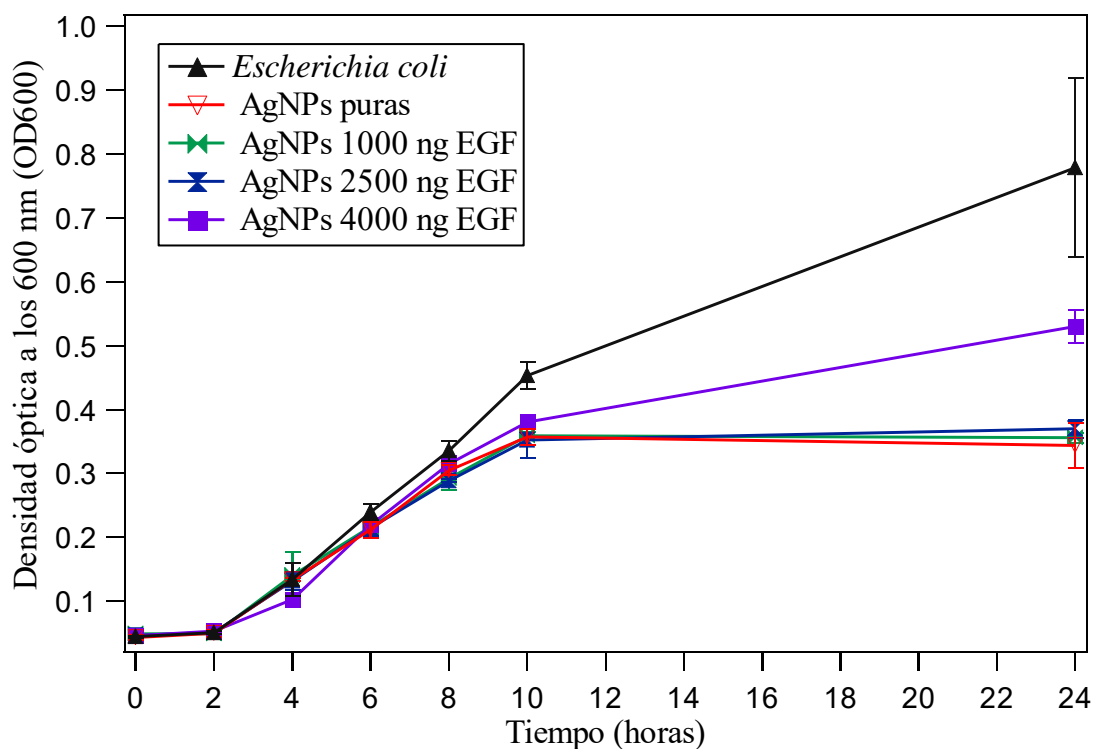


Figura 33. OD600 de *Escherichia coli* en presencia de AgNPs puras y en interacción con rh EGF.

#### 4.4.2. AgNPs con 4000 ng de rh EGF bajo el medio de síntesis y fisiológico

La Figura 34 muestra la cantidad de *Escherichia coli* en CFU/mL en presencia de 200  $\mu$ g/mL de AgNPs puras y en interacción con 4000 ng de rh EGF bajo medio de síntesis y en presencia de 200  $\mu$ g/mL de AgNPs puras y en interacción con 4000 ng de rh EGF después de 72 horas bajo medio fisiológico. Como se observa, bajo el medio de síntesis hay disminución de la actividad antibacterial cuando las AgNPs están en presencia del polipéptido como lo referido en la sección 4.4.1. (AgNPs en interacción con diferentes cantidades de rh EGF). Las Figuras 35, 36 y 37 muestran las placas de cultivo de *E. Coli* puro, en presencia de AgNPs y en presencia de AgNPs 4000 ng EGF, respectivamente. Por otro lado, bajo el medio fisiológico la tendencia es equivalente, pero se observa la disminución de la actividad antibacterial de las AgNPs debido su

desestabilización a causa del medio salino y su interacción con el BSA (Gnanadhas et al., 2013).

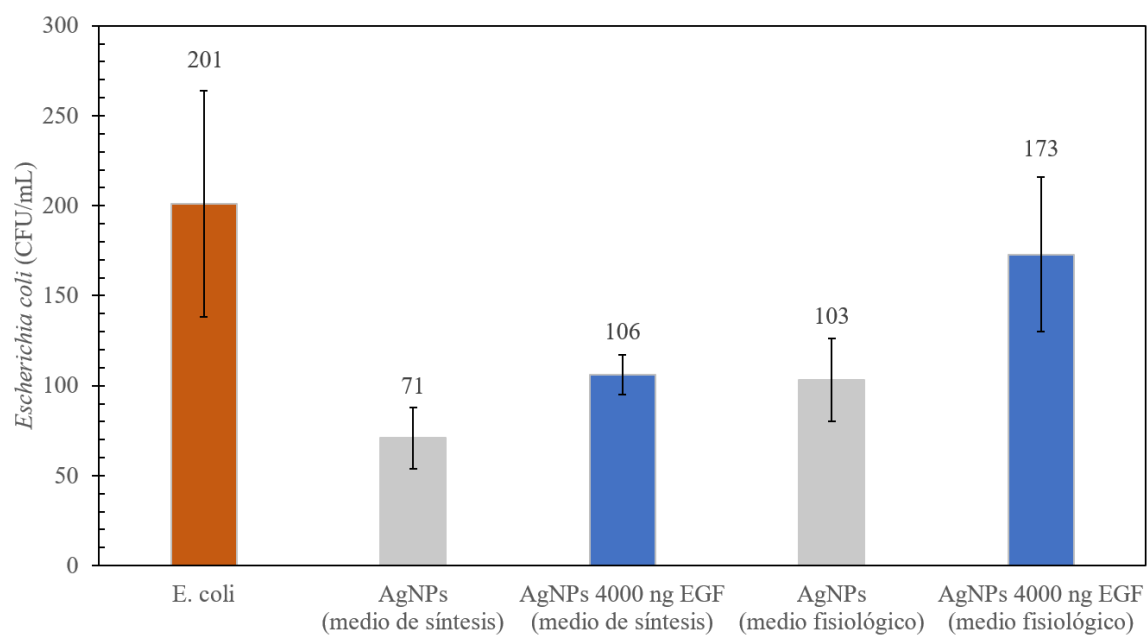


Figura 34. *Escherichia coli* en CFU/mL en presencia de AgNPs puras y en interacción con rh EGF.



Figura 35. *Escherichia coli*.



*Figura 36. Escherichia coli en presencia de 200 µg/mL AgNPs puras bajo el medio de síntesis.*



*Figura 37. Escherichia coli en presencia de 200 µg/mL AgNPs 4000 ng rh EGF bajo el medio de síntesis.*

## Capítulo 5

### Conclusiones

La evaluación de la interacción entre las AgNPs y el rh EGF confirma la adhesión del rh EGF sobre las AgNPs en un porcentaje de eficiencia de carga mayor al 94% e indica la mayor estabilización del rh EGF, logrando así una coexistencia entre la actividad biológica del polipéptido y la actividad antibacterial de las AgNPs lo que convierte al nano compuesto en un candidato potencial para su uso en sistemas que mejoren la regeneración de los tejidos epiteliales. En la optimización del proceso de síntesis de las AgNPs mediante el método de Frens, la comparación de los valores de longitud de onda máxima e intensidad de absorbancia obtenidos a concentraciones de nitrato de plata de 0.6, 0.8 y 1.0 mM demuestra que para un tiempo de reacción de 20 minutos haciendo uso de una concentración de nitrato de plata 1.0 mM se obtuvo una mayor absorbancia en relación con una baja distribución de tamaño; la cual además, presentó porcentajes de variación durante el proceso de reproducibilidad de la síntesis de 5.55%, 0.71% y 4.31% para los valores de absorbancia, longitud de onda máxima y FWHM, respectivamente. Habiéndose comprobado la reproducibilidad del proceso, se demuestra que el tiempo de reacción y concentración de nitrato de plata óptimos fueron de 20 minutos y 1.0 mM, respectivamente, obteniéndose AgNPs de 5.8 nm y 68.8 nm de forma esférica y cilíndrica. Por otro lado, la comparación de las AgNPs obtenidas mediante el método de Frens y el método regular concluye que para el método de Frens se obtiene una concentración de AgNPs tres veces mayor que el método de regular, además para cada caso se obtuvo valores de potencial zeta de  $-27.7 \pm 0.3$  mV para el método de Frens y  $-1.3 \pm 0.3$  mV para el método regular, indicando la mayor estabilidad



de las AgNPs sintetizadas mediante el método de Frens. La evaluación de la interacción entre las AgNPs y el BSA como proteína modelo permitió la verificación del protocolo establecido para lograr la interacción proteína – nanopartícula, además los análisis mediante espectroscopía UV-Vis y DLS establecieron que para una relación molar BSA:AgNPs de 0.018 se obtuvo la mayor interacción entre las AgNPs y el BSA con ningún cambio presumible en la estructura proteica, aunque mayores estudios sobre la proteína son necesarios para verificar la conformación proteica para distintos valores de relaciones molares BSA:AgNPs. Además, aunque en base a la revisión bibliográfica, en el presente trabajo se propone que los efectos *blue shift*, *red shift* y *dip and rise* observados mediante espectroscopía UV-Vis son causados por el desplazamiento del citrato llevado a cabo incluso en presencia de pequeñas concentraciones de BSA, las cuales no son suficientes para estabilizar a todas las AgNPs lo que resulta en su coalescencia; además de plantear la posibilidad de que el cambio de la absorbancia de las AgNPs en interacción con BSA sea debido a los cambios del efecto plasmónico en la superficie de las NPs, se ha exhibido la falta de una explicación concisa de este fenómeno en base a resultados experimentales, abriendo así una oportunidad para el estudio profundo de la interacción entre el BSA y las AgNPs en distintos medios y haciendo énfasis en los posibles cambios estructurales de la proteína. El estudio de la interacción entre las AgNPs con 1000, 2500 y 4000 ng de rh EGF mediante espectroscopía UV-Vis demuestra el acoplamiento del rh EGF sobre las AgNPs a través de los efectos *dip* y *red shift* obtenidos, lo que a su vez es reafirmado mediante TEM y muestra que se presenta una mayor aglomeración de rh EGF sobre la superficie de las AgNPs a mayores cantidades de rh EGF. Además, debido a que la variación de los parámetros no fue significativa las AgNPs en interacción con rh EGF fueron estables

hasta 7 días después de su síntesis. Por otro lado, el estudio mediante espectroscopia FTIR, indica que a una mayor cantidad de rh EGF en interacción con las AgNPs se obtiene una mayor estabilización del bucle-B necesario para la actividad biológica del polipéptido y la permanencia de los puentes disulfuros necesarios para la afinidad con el EGFR, aunque pruebas a nivel celular son necesarios para la significancia de estos resultados. Las pruebas de ELISA, mostraron un porcentaje de eficiencia de carga de 99.90%, 99.20% y 94.24% de rh EGF sobre las AgNPs para las cantidades de 1000, 2500 y 4000 ng, respectivamente. La liberación del polipéptido bajo condiciones fisiológicas demostró una mayor liberación acumulativa para la muestra AgNPs 4000 ng EGF. Debido a la mayor interacción con las AgNPs y, por lo tanto, la mayor estabilización de la proteína y su mayor tasa de liberación, las AgNPs en interacción con 4000 ng de rh EGF son indicadas como la más óptima para ser usada en el desarrollo de materiales que puedan ayudar al proceso de regeneración epitelial. Por último, los ensayos antibacteriales contra *Escherichia coli* mediante OD600 en el medio de síntesis demuestran la permanencia de la actividad antibacterial de los 50 ug/mL AgNPs en presencia de los 4000 ng de rh EGF, aunque en un menor grado que las AgNPs puras e interactuando con 1000 y 2500 ng de rh EGF en una concentración de 50 ug/mL, en las cuales sus poderes antibacteriales son estadísticamente equivalentes. Los ensayos antibacteriales contra *Escherichia coli* mediante el sembrado de la bacteria en presencia de 200 µg/mL de AgNPs puras y en interacción con 4000 ng de rh EGF bajo el medio fisiológico y de síntesis, demuestra que, aunque hay una disminución del poder antibacterial en el medio fisiológico, para ambos casos se mantiene la actividad antibacterial para las AgNPs con 4000 ng de rh EGF aunque en menor grado que las AgNPs puras.

## Capítulo 6

### Referencias Bibliográficas

- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.*, 4(8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>
- Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., & Butler, H. J. (2015). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, 9(8), 1771–1791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
- Banerjee, V., & Das, K. P. (2013). Interaction of silver nanoparticles with proteins: A characteristic protein concentration dependent profile of SPR signal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.052>
- Beave, G. H., Holida, E. R., & Joep, E. M. (1950). The ultra-violet absorption spectra of the aromatic amino acids in proteins and related compounds.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bhattacharjee, T. T., Castilho, M. L., Oliveira, I. R. De, Jesus, V. P. S., Hewitt, K. C., & Raniero, L. (2017). FTIR study of secondary structure changes in Epidermal Growth Factor by gold nanoparticle conjugation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.11.009>
- Cabrera, C., Carriquiry, G., Pierinelli, C., Reinoso, N., Arias-Stella, J., & Paino, J. E. (2012). The role of biologically active peptides in tissue repair using umbilical cord mesenchymal stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1270(1), 93–97. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06727.x>
- Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G. J., & Puentes, V. (2010). Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano*, 4(7), 3623–3632. <https://doi.org/10.1021/nn901372t>
- Castillo, F. F. (2005). Assessment of growth of silver nanoparticles synthesized from an ethylene glycol – silver nitrate – polyvinylpyrrolidone solution, 25, 438–448. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2004.07.010>
- Chatterjee, T., Chakraborti, S., Joshi, P., Singh, S. P., & Gupta, V. (2010). The effect of zinc oxide nanoparticles on the structure of the periplasmic domain of the *Vibrio cholerae* ToxR protein, 277, 4184–4194. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07807.x>
- Chaudhury, K., Kumar, V., Kandasamy, J., & RoyChoudhury, S. (2014). Regenerative nanomedicine: current perspectives and future directions. *Int J Nanomedicine*, 9, 4153–4167. <https://doi.org/10.2147/IJN.S45332>
- Cytodiagnosics. Silver Nanoparticle Handling and Storage. Available online: <http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Silver-Nanoparticle-Handling-and-Storage-d13.htm> (accessed on 5 June 2017).
- Costerton, J. W. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>

- Cross, M., & Dexter, T. M. (1991). Growth Factors in Development , Transformation , and Tumorigenesis. *Cell*, 64, 271–280.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90638-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90638-F)
- Dasgupta, N., Ranjan, S., Patra, D., Srivastava, P., Kumar, A., & Ramalingam, C. (2016a). Bovine serum albumin interacts with silver nanoparticles with a “side-on” or “end on” conformation. *Chemico-Biological Interactions*, 253, 100–111.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.018>
- Dasgupta, N., Ranjan, S., Patra, D., Srivastava, P., Kumar, A., & Ramalingam, C. (2016b). Bovine Serum Albumin interacts with Silver nanoparticles with a “side-on” or “end on” conformation. *Chemico-Biological Interactions*.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.018>
- DeCarbo, W. (2009). Bilayered skin substitute to augment healing of chronic wounds in diabetic patients. *Foot and Ankle Specialist*, 2(6), 299–302.  
<https://doi.org/10.1177/1938640009354041>
- Esquirol-caussa, J., Herrero-vila, E., Metanálisis, R., & Caussa, E. (2017). Factor de Crecimiento Epidérmico ( EGF ) y geles de silicona en el abordaje de heridas , quemaduras y cicatrices : revisión de la literatura management : literature review Material y método, 43.
- Fasasi, Y. A., Mirjankar, N., & Fasasi, A. (2015). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Found in Egusi, 1(1), 1–4. <https://doi.org/10.11648/j.ajaic.20150101.11>
- Fernández-Busnadiego, R., & Lucic, V. (2012). The cell at molecular resolution: principles and applications of cryo-electron tomography. *Cellular Imaging Techniques* (First Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385872-6.00007-6>
- Freed, L. E., Marquis, J. C., Nohria, A., Emmanuel, J., Mikos, A. G., & Langer, R. (1993). Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27(1), 11–23.
- Frens, G. (1973). Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*, 241(105), 20–22.  
<https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
- Gakiya-Teruya, M., Palomino-Marcelo, L., & Rodriguez-Reyes, J. C. F. (2018). Synthesis of Highly Concentrated Suspensions of Silver Nanoparticles by Two Versions of the Chemical Reduction Method. *Methods and Protocols*, 2(1), 3.  
<https://doi.org/10.3390/mps2010003>
- Garidel, P., & Schott, H. (2006). Fourier-Transform Midinfrared Spectroscopy for Analysis and Screening of Liquid Protein Formulations. *BioProcess Technical*, 1, 48–55.
- Gauthier, M. A., & Zhao, C. (2010). Polymer Chemistry.  
<https://doi.org/10.1039/c0py90001j>
- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., & Rotello, V. M. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1307–1315.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>

- Gnanadhas, D. P., Thomas, M. Ben, Thomas, R., Raichur, A. M., & Chakravortty, D. (2013). Interaction of silver nanoparticles with serum proteins affects their antimicrobial activity in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 4945–4955. <https://doi.org/10.1128/AAC.00152-13>
- Griffiths, R. (1981). Second derivative and Fourier self -deconvolution approaches to resolution enhancement of of Fourier Fourier transform transform infrared infrared ( FTIR ).
- Hamdan, S., Pastar, I., Drakulich, S., Dikici, E., Tomic-Canic, M., Deo, S., & Daunert, S. (2017). Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications. *ACS Central Science*, acscentsci.6b00371. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00371>
- Harris, R. A., Jenner, P., & Snyder, S. H. (2014). *International Review of Series Editors* (Vol. 110). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404706-8.09993-9>
- Jain, N., Bhargava, A., Rath, M., Dilip, R. V., & Panwar, J. (2015). Removal of Protein Capping Enhances the Antibacterial Efficiency of Biosynthesized Silver Nanoparticles, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134337>
- Jasmin, Š. (2016). A review on Nanoparticle and Protein interaction in biomedical applications, 4(2). <https://doi.org/10.21533/pen.v4i2.62>
- Juffmann, T., Koppell, S. A., Klopfer, B. B., Ophus, C., Robert, M., & Kasevich, M. A. (2017). Multi-pass transmission electron microscopy. *Scientific Reports*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01841-x>
- Jung, T., Breitenbach, A., & Kissel, T. (2000). Sulfobutylated poly ( vinyl alcohol ) - graft-poly ( lactide-co- glycolide ) s facilitate the preparation of small negatively charged biodegradable nanospheres, 67, 157–169.
- Karin, M., & Clevers, H. (2016). Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *N a T U R E*, 529, 307–315. <https://doi.org/10.1038/nature17039>
- Karthiga, D., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2017). Spectroscopic studies on the interactions of bovine serum albumin in presence of silver nanorods. *Journal of Molecular Liquids*, 232, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.02.096>
- Khan, M. Z. H., Tareq, F. K., Hossen, M. A., & Roki, M. N. A. M. (2018). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using coriandrum sativum leaf extract, 13(1), 158–166.
- Kim, N. A., Lim, D. G., Lim, J. Y., Kim, K. H., & Jeong, S. H. (2014). Fundamental analysis of recombinant human epidermal growth factor in solution with biophysical methods, 9045, 1–7. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.859152>
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assign-, 39(20745001), 549–559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
- Korrapati, P. S., Karthikeyan, K., Satish, A., Krishnaswamy, V. R., Venugopal, J. R., & Ramakrishna, S. (2016). Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 67, 747–765. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.074>
- Krafts, K. P. (2010). The hidden drama Tissue repair, (December), 1–9. <https://doi.org/10.4161/org6.4.12555>

- Lacerda, S. H. D. P., Park, J. J., Meuse, C., Pristinski, D., Becker, M. L., Karim, A., & Douglas, J. F. (2010). Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins, *4*(1), 365–379.
- Laurent, S. (2013). Protein-Nanoparticle Interactions Protein Corona : Applications and Challenges, (January). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-37555-2>
- Lee, K., Silva, E. A., & Mooney, D. J. (2011). Growth factor delivery-based tissue engineering : general approaches and a review of recent developments, (August 2010), 153–170.
- Li, J., & Yunfeng, L. (2015). Protein Nanocapsule Based Protein Carriers for Industrial and Medical.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., & Dawson, K. A. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts, *105*(38), 14265–14270.
- Mahanthappa, M., Gowda, B. G., & Gowda, J. I. (2016). Spectroscopic , voltammetry and molecular docking study of binding interaction of antipsychotic drug with bovine serum albumin. *J. Electrochem. Sci. Eng.*, *6*(2), 155–164. <https://doi.org/10.5599/jese.205>
- Mariam, J., Dongre, P. M., & Kothari, D. C. (2011). Study of interaction of silver nanoparticles with bovine serum albumin using fluorescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, *21*(6), 2193–2199. <https://doi.org/10.1007/s10895-011-0922-0>
- Mason, C., & Dunnill, P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine*, *3*(1), 1–5. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.1.1>
- Mikhailovna, E., Aslan, E., Kubatiev, A., & Ivanovich, V. (n.d.). *Biological Effects of Metal Nanoparticles*.
- Mordorski, B., Rosen, J., & Friedman, A. (2015). Nanotechnology as an innovative approach for accelerating wound healing in diabetes, *5*, 329–332.
- Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P., & Aminabhavi, T. M. (2008). Nano / micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly ( D , L -lactide- co -glycolide ) and its derivatives, (March 2015). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.013>
- Musyanovych, A., Fetz, V., Tenzer, S., Docter, D., Hecht, R., Schlenk, F., ... Stauber, R. H. (2013). Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotechnology*, (September), 1–10. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.181>
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J., ... Yokoyama, S. (2002). Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains, *110*, 775–787.
- Papini, R. (2004). Management of burn injuries of various depths. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *329*(7458), 158–160. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7458.158>
- Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., & Fernig, D. G. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *The Analyst*, *139*(19), 4855. <https://doi.org/10.1039/C4AN00978A>
- Parani, M., Lokhande, G., Singh, A., & Gaharwar, A. K. (2016). Engineered Nanomaterials for Infection Control and Healing Acute and Chronic Wounds. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *8*(16), 10049–10069. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b00291>

- Pareek, V., Bhargava, A., Bhanot, V., & Gupta, R. (2018). Formation and Characterization of Protein Corona Around Nanoparticles : A Review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18(June), 6653–6670. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15766>
- Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W., & Seal, S. (2007). Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential, 28, 4600–4607. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.029>
- Patungwasa W, H. J. (2008). pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction. *Mater Chem Phys* 108:45.
- Pinedo-Flores, A., Alcazar, B., & Rodriguez-Reyes, J. C. F. (2018). Protocol for the synthesis of silver nanoparticles using sodium citrate and sodium borohydride as reducing agents, (March). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12852.76168>
- Pino, P., Pelaz, B., Zhang, Q., Ulrich, G., & Parak, W. J. (2014). Protein corona formation around nanoparticles – from the past to the future, 301–313. <https://doi.org/10.1039/c3mh00106g>
- Pinto VV, Ferreira MJ, S. R. et al. (2010). Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: effect of the synthesis and storage conditions. *Colloids Surf A* 364:19.
- Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., & Yahia, L. H. (n.d.). *Protein- Nanoparticle Interactions*.
- Ravindran, A., Chandran, P., & Khan, S. S. (2013). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Biofunctionalized silver nanoparticles : Advances and prospects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.036>
- Ravindran, A., Singh, A., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2010a). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin ( BSA ). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.005>
- Ravindran, A., Singh, A., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2010b). Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.005>
- Ray, T., Lettiere, B., Rutte, J. De, & Pennathur, S. (2015). Quantitative Characterization of the Colloidal Stability of Metallic Nanoparticles using UV-vis Absorbance Spectroscopy Table S1 : Nanoparticle Characterization Methods Nanoparticle Properties Estimation of Free-CTAB in Solution Addendum to DLS / PIP Case.
- Rigo, C., Ferroni, L., Tocco, I., Roman, M., Munivrana, I., Gardin, C., & Zavan, B. (2013). Active silver nanoparticles for wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4817–4840. <https://doi.org/10.3390/ijms14034817>
- Roy, S., & Das, T. K. (2015). Investigation of binding of bovine serum albumin with metallic nanoparticles, 7(5), 1203–1212.
- Saeb, A. T. M., Alshammari, A. S., Al-brahim, H., & Al-rubeaan, K. A. (2014). Production of Silver Nanoparticles with Strong and Stable Antimicrobial Activity against Highly Pathogenic and Multidrug Resistant Bacteria.

- Sahoo, S. K., Parveen, S., & Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1), 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.11.008>
- Salis, A., Boström, M., Medda, L., Cugia, F., Barse, B., Parsons, D. F., ... Monduzzi, M. (2011). Measurements and theoretical interpretation of points of zero charge/potential of BSA protein. *Langmuir*, 27(18), 11597–11604. <https://doi.org/10.1021/la2024605>
- Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., ... Medintz, I. L. (2013). Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules : Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology.
- Satzer, P., Svec, F., Sekot, G., & Jungbauer, A. (2016). Protein adsorption onto nanoparticles induces conformational changes : Particle size dependency , kinetics , and mechanisms. *Eng. Life Sci.*, 16, 238–246. <https://doi.org/10.1002/elsc.201500059>
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., ... Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/373699a0>
- Shamaila, S., Zafar, N., Riaz, S., Sharif, R., & Nazir, J. (2016). Gold Nanoparticles : An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen, 1–10. <https://doi.org/10.3390/nano6040071>
- Shannahan, J. H., Lai, X., Ke, P. C., Podila, R., Brown, J. M., & Witzmann, F. A. (2013). Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074001>
- Shrivastava, S., & Dash, D. (2010). NANO-MICRO LETTERS Label-free colorimetric estimation of proteins using nanoparticles of silver, 2(3), 164–168. <https://doi.org/10.5101/nml.v2i3.p164-168>
- Šileikaite, A., Puišo, J., Prosycevas, I., Tamulevicius, S. (2009). Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate, 15(1), 1–7.
- Sklar, L. A., Hudson, B. S., & Simonir, R. D. (1977). Conjugated Polyene Fatty Acids as Fluorescent Probes : Binding to Bovine Serum Albumin. *Biochemistry*, 16, 5100–5108.
- Sukumaran, S. (2017). Protein secondary structure elucidation using FTIR spectroscopy.
- Sun, T. M., Wang, Y. C., Wang, F., Du, J. Z., Mao, C. Q., Sun, C. Y., ... Wang, J. (2014). Cancer stem cell therapy using doxorubicin conjugated to gold nanoparticles via hydrazone bonds. *Biomaterials*, 35(2), 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.011>
- Taylor, J. L. (2014). *Instrumental Limitations for High Absorbance Measurements in Noise*.
- Tetenbaum, J., & Miller, L. M. (2001). A New Spectroscopic Approach to Examining the Role of Disulfide Bonds in the Structure and Unfolding of Soybean Trypsin Inhibitor †, 9, 12215–12219.
- Thanh, T. (2014). The Life of Nanoparticles in Contact with Biological Media and Entities The Life of Nanoparticles in Contact with Biological Media and Entities.
- Thermo Fisher Scientific. (2010). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual*.



- Tkachenko, A. G., Xie, H., Liu, Y., Coleman, D., Ryan, J., Glomm, W. R., Feldheim, D. L. (2004). Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: Comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjugate Chemistry*, 15(3), 482–490. <https://doi.org/10.1021/bc034189q>
- Val'dner, Vdokimov & Mishina (2010). Production and study of nanostructures. *BINOM (The BKL Publishers)*, 146.
- Vial, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2016). Recent advances using gold nanoparticles as a promising multimodal tool for tissue engineering and regenerative medicine. *Current opinion in solid state & material science*. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2016.03.006>
- Wagner, S., Coerper, S., Fricke, J., Hunt, T. K., Hussain, Z., Elmlinger, M. W., ... Becker, H. D. (2003). Comparison of inflammatory and systemic sources of growth factors in acute and chronic human wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 11(4), 253–260. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2003.11404.x>
- Wang, G., Lu, Y., Hou, H., & Liu, Y. (2017). Probing the binding behavior and kinetics of silver nanoparticles with bovine serum albumin. *RSC Adv.*, 7(15), 9393–9401. <https://doi.org/10.1039/C6RA26089F>
- Wang, Z., Zhang, K., Zhao, J., Liu, X., & Xing, B. (2010). Chemosphere Adsorption and inhibition of butyrylcholinesterase by different engineered nanoparticles. *Chemosphere*, 79(1), 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.051>
- Watson, T. (2012). Soft tissue repair and healing review. Retrieved from <http://www.electrotherapy.org/modality/soft-tissue-repair-and-healing-review>
- Wolfram, J., Yang, Y., Shen, J., Moten, A., & Chen, C. (2014). The nano-plasma interface: Implications of the protein corona. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (11). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.035>
- Xu, S., Shi, J., Feng, D., Yang, L., & Cao, S. (2014). Hollow hierarchical hydroxyapatite / Au / polyelectrolyte hybrid microparticles for multi- responsive drug delivery †. *Journal of Materials Chemistry B: Materials for Biology and Medicine*, 2, 6500–6507. <https://doi.org/10.1039/C4TB01066C>
- Yadav, I., Aswal, V. K., & Kohlbrecher, J. (2015). Electrolyte effect on the phase behavior of silica nanoparticles with lysozyme and bovine-serum-albumin proteins, 052306, 1–9. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.91.052306>
- Yang, C., Wu, P., Huang, Y., & Tsai, Y. (2004). A New Approach for Determining the Stability of Recombinant Human Epidermal Growth Factor by Thermal Fourier Transform Infrared ( FTIR ) Microspectroscopy. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 22(Number 1), 37–41. <https://doi.org/10.1080/07391102.2004.10506985>
- Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., & Yu, S. (2015). Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>
- Yang, S., Liu, Y., Wang, Y., & Cao, A. (2013). Biosafety and Bioapplication of Nanomaterials by Designing Protein – Nanoparticle Interactions, 1–19. <https://doi.org/10.1002/sml.201201492>
- Zhang, L., & Webster, T. J. (2009). Nanotechnology and nanomaterials : Promises for improved tissue regeneration, 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2008.10.014>

- Zhao, X., Liu, R., Teng, Y., & Liu, X. (2011). The interaction between Ag<sup>+</sup> and bovine serum albumin: A spectroscopic investigation. *Science of the Total Environment*, 409(5), 892–897. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.11.004>
- Zheng, M., Gu, M., Jin, Y., & Jin, G. (2001). Optical properties of silver-dispersed PVP thin film, 36, 853–859.
- Zhou, J. D. A., Wang, S. H. U. A., Liu, R. U. I., & Zhou, C. J. (2013). Study of the biological effectiveness of a nanosilver - epidermal growth factor sustained - release carrier, 1231–1235. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.952>

## Capítulo 7

### Vita



#### PERSONAL

NOMBRE LUIS PALOMINO MARCELO  
NACIMIENTO 26.11.1992  
ESTADO CIVIL SOLTERO  
NACIONALIDAD PERUANA

#### CONTACTO

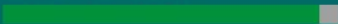
CELULAR +51 969191731  
EMAIL luispalomino026@gmail.com  
DIRECCIÓN MZ.N LT.18 URB. STO.DOMINGO  
2DA ETAPA - CARABAYLLO

#### IDIOMAS

INGLÉS  
Hablar 7 Escritura 7

#### HABILIDADES PERSONALES

GERENCIA Y DIRECCIÓN



PROACTIVIDAD



TRABAJO EN EQUIPO



COMUNICACIÓN



#### PASATIEMPOS



LEER



VER DOCUMENTALES



NADAR



VIAJAR

#### REDES ACADÉMICAS



Luis Palomino-Marcello



Luis Palomino Marcello



Luis Palomino Marcello

#### REFERENCIAS

Ing. Franklin Marcelo Alonso  
CEO Interfono S.A.C.  
Email: franklin@interfono.com

PhD. Juan Carlos F. Rodríguez Reyes  
Profesor, Departamento de Bioingeniería e  
Ingeniería Química - UTEC  
Email: jcrodriguez@utec.edu.pe

#### PERFIL

Asistente de investigación y docencia en la Universidad de Ingeniería y Tecnología-UTEC. Bachiller de la carrera de Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, perteneciente al décimo superior y con actitudes de liderazgo, trabajo en equipo y motivación. Mis áreas específicas de interés son la síntesis y estudio de nanomateriales en relación a las ciencias médicas y medioambientales. Mi experiencia en investigación esta enfocada en sistemas coloidales, síntesis de nanopartículas metálicas y poliméricas por métodos químicos y desarrollo de nuevos materiales. Mi objetivo profesional es lograr el desarrollo de nuevas tecnologías capaces de solucionar problemas sociales y medioambientales a través de la mejora continua e innovación.

#### EXPERIENCIA DE TRABAJO

- **Asistente de Investigación y Docencia en Departamento de Ciencias-UTEC**  
Asistente de coordinación del curso de Química General del Departamento de Ciencias. Mi labor está enfocada en la generación de contenido usando CANVAS LMS, corrección de prácticas y dictado de asesorías. Además he dirigido un curso titulado "Síntesis de nanopartículas y su interacción con biomoléculas para aplicaciones en nanomedicina" del Departamento de Bioingeniería e Ingeniería Química. (Desde Enero del 2019 hasta la actualidad)
- **Asistente de Investigación en Laboratorio de Bioingeniería-UTEC**  
Personal de investigación en el proyecto titulado "Estudio del potencial diferencial de péptidos biológicamente activos del secretoma de células madres mesenquimales en regeneración de tejidos dañados y desarrollo de un procedimiento de aislamiento y carga de estos péptidos sobre nanopartículas como vector de transporte al tejido dañado" cual es un proyecto colaborativo entre UTEC, Cleveland Clinic, Universidad de Connecticut y Montana S.A. y financiado por Concytec. He trabajado en la síntesis de nanopartículas de PLGA, plata y oro y en el estudio de su interacción con albúmina de suero bovino, factor de crecimiento epidermal e interleucina 1-beta. La actividad antimicrobiana se evaluó con *Escherichia coli*. (Dr. Juan Carlos Rodríguez/Enero 2017 - Diciembre 2018/Pagado)
- **Asistente de Investigación en Laboratorio de Química Cuántica y Nuevos Materiales-UNMSM**  
Síntesis de nanopulvos de cobre estables mediante descomposición térmica, utilizando la reacción de Maillard en sistemas de tipo HDA/Glu y utilizando glicerol como agente reductor. Se obtuvieron nanopartículas de Cu estables en contacto con el aire con un tamaño de 50 nm y resistentes hasta 185°C durante 15 minutos. La síntesis se llevó a cabo mediante microondas-ultrasonido. Los nanopulvos para fines antibacterianos se caracterizaron mediante XDR y UV-Vis. (Prof. Aldo Guzman Duxtan/Enero 2015 - Diciembre 2016/Voluntario)
- **Asistente de Contabilidad en Interfono S.A.C.**  
Asistente de Sistemas y Contabilidad. (CEO Franklin Marcelo/Julio 2010-Diciembre 2011/Pagado)

#### PAPERS

- SÍNTESIS DE SUSPENSIONES DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A ALTAS CONCENTRACIONES POR DOS VERSIONES DEL MÉTODO DE REDUCCIÓN QUÍMICA Miguel Gakiya, Luis Palomino y Juan Carlos Rodriguez. *Methods Protoc.* 2019, 2(1), 3. <https://doi.org/10.3390/mps2010003>
- PROTOCOLO PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON BIOMOLÉCULAS: EL CASO DE LA ALBÚMINA DE SUERO BOVINO (BSA) Luis Palomino, Miguel Gakiya y Juan Carlos Rodriguez. *Research Gate.* 2019. <https://doi.org/10.13140/rg.2.2.23518.28485>
- QUÍMICA CLICK PARA LA CARGA DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO (VIHWG-(alkyne)-G-NH2) SOBRE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL CONTRA *E. coli* Miguel Gakiya-Teruya, Luis Palomino-Marcelo, Scott Pierce, Alfredo M. Angeles-Boza y Juan Carlos Rodriguez. *En colaboración con UCONN - En edición.*
- SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y ORO USANDO PHF COMO AGENTE REDUCTOR Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL CONTRA *E. coli* Miguel Gakiya, Luis Palomino, Vijay Krishna y Juan Carlos Rodriguez. *En colaboración con Cleveland Clinic - En edición.*
- SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y PLGA CARGADOS CON FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL Y SU EVALUACIÓN EN REGENERACIÓN DE TEJIDOS EPITELIALES Luis Palomino, Miguel Gakiya, Andrew Camardo, Anand Ramamurthi y Juan Carlos Rodriguez. *En colaboración con Cleveland Clinic - En edición.*

#### POSTERS

- OCTUBRE 2018 ■ ESTUDIO DEL ACOPLAMIENTO DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO (VIHWG-(alkyne)-G-NH2) SOBRE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL CONTRA *E. coli* Congreso Iberoamericano de Química (Lima, Perú)
- OCTUBRE 2018 ■ EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EGF PARA SU USO EN REGENERACIÓN DE TEJIDOS EPITELIALES Congreso Iberoamericano de Química (Lima, Perú)
- AGOSTO 2018 ■ QUÍMICA CLICK PARA LA CARGA DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO (VIHWG-(alkyne)-G-NH2) SOBRE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL CONTRA *E. coli* 256th ACS National Meeting (Boston, USA)
- MARZO 2017 ■ ESTUDIO QUÍMICO Y FITOQUÍMICO DE *Rauvolfia tetraphylla* L. "CURARINA" XXVIII Congreso de la Sociedad Química Peruana 'Dr. Gaston Pons Muzzo' (Lima, Perú)

#### PASANTÍA

- FEBRERO ■ LERNER RESEARCH INSTITUTE - CLEVELAND CLINIC (Ohio, USA)
- MARZO ■ DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOMÉDICA- Ph.D. Anand Ramamurthi Lab
- 2018 ■ Síntesis de nanopartículas de PLGA cargadas de EGF y su evaluación de eficiencia de encapsulación, liberación bajo condiciones fisiológicas y ensayos de nanotoxicidad.